ASPEKTE DES ASSIMILATORISCHEN SCHWEFELSTOFFWECHSELS IN RHODOSPIRILLACEAE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
JOHANNES FRIEDRICH IMHOFF
aus
PRÜM

BONN 1980

ASPEKTE DES ASSIMILATORISCHEN SCHWEFELSTOFFWECHSELS IN RHODOSPIRILLACEAE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

JOHANNES FRIEDRICH IMHOFF

aus

PRÜM

BONN 1980

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der mathematisch-naturwisschenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Mikrobiologie durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. H.G. Trüper
Korreferent: Prof. Dr. J.-H. Klemme

Tag der mündlichen Prüfung: 30.April 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	9
1. Sulfatassimilation	9
2. Assimilatorische Sulfatreduktion	10
3. Schwefelstoffwechsel phototropher Bakterien	19
4. Ziele dieser Arbeit	23
MATERIAL UND METHODEN	25
1. Organismen	25
2. Kulturbedingungen	26
3. Herstellung zellfreier Extrakte	29
4. Proteinbestimmung	29
5. Enzymtests	30
6. Anreicherung von Kofaktoren für die Sulfotransferase	33
7. Chemische Bestimmungsmethoden	34
8. Nachweis von Nukleotiden	34
9. Präparate isoelektrischer Fokussierung	36
10. Molekulargewichtsbestimmung	37
11. Chemikalien	37
ERGEBNISSE	
I Synthese und Reinigung der Schwefelnukleotide APS und PAPS	39
1. Synthese und Reinigung von $AP^{32}S$	41
2. Synthese und Reinigung von $AP^{35}S$	45
3. Synthese und Reinigung von $PAP^{32}S$ und $PAP^{35}S$	47
4. Diskussion	53
II Nukleotidspezifität der Sulfatreduktion	57
1. Nukleotidspezifität der Sulfotransferasen in Rhodospirillaceae	59
2. Nukleotidspezifität der Sulfotransferasen in einigen chemoorganotrophen Bakterien und Hefe	67
3. Diskussion	70

Seite

III Eigenschaften der Sulfotransferasen aus Rhodospirillaceae 73
1. Lokalisierung in der Zelle 73
2. pH-Optima 74
3. Einfluß von Thiolverbindungen 74
4. Einfluß von 5'-AMP, 3'-AMP und 3',5'-ADP 76
5. Einfluß von Natrium und Kalium 77
6. Abhängigkeit von einem niedermolekularen nicht dialysierbarem Kofaktor 78
7. Stabilität der Sulfotransferasen 85
8. Molekulargewichte 89
9. Isoelektrischer Punkt 90
10. Diskussion 93

IV Sulfataufnahme in Rps. sulfidophila 96
1. Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration 96
2. Hemmung der Sulfataufnahme durch reduzierte Schwefelverbindungen 98
3. Diskussion 102

V Regulation der Sulfatassimilation 104
1. Wachstum auf verschiedenen Schwefelquellen 105
2. Regulation der Enzymsynthese 108
3. Diskussion 110

ALLGEMEINE DISKUSSION 114

ZUSAMMENFASSUNG 125

LITERATURVERZEICHNIS 128

Abkürzungen :

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAL	2,3-Dimercaptopropan-1-ol
Cys	Cystein
DTE	1,4-Dithioerythrit
E	Enzymeinheiten
E.	Escherichia
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GSH	reduziertes Glutathion
GS-SH	Glutathionpersulfid
$GS-SO_3$	S-Sulfoglutathion
ME	Mercaptoäthanol
MG	Molekulargewicht
MV	Methylviologen
OAS	O-Acetylserin
PAP	3', 5'-Diphosphoadenosin
PAPS	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfat
PPase	anorganische Pyrophosphatase
PP_i	anorganisches Pyrophosphat
Ps.	Pseudomonas
R.	Rhodospirillum
Rc.	Rhodocyclus
Rm.	Rhodomicrobium
Rps.	Rhodopseudomonas
TÄA	Triäthanolamin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxmethyl)aminomethan
U	Umdrehungen

EINLEITUNG

1. Sulfatassimilation

Sulfat wird von vielen Lebewesen zur Bildung von Sulfatestern von Polysacchariden, Phenolen, Steroiden und anderen organischen Verbindungen benötigt. Viele Organismen können außerdem Sulfat bis zur Reduktionsstufe des Sulfids reduzieren und dadurch als Schwefelquelle für die Synthese der Aminosäuren Cystein und Methionin verwenden. Während die Fähigkeit zur Bildung von organischen Sulfatestern in Vertretern aller Organismengruppen gefunden wird, besitzen tierische Organismen einschließlich der Protozoen die Reaktionen der assimilatorischen Sulfatreduktion nicht. Pflanzen, Algen, Pilze, Dinoflagellaten, sowie Bakterien einschließlich der Cyanobakterien können Sulfat für assimilatorische Zwecke reduzieren. Beide Reaktionsfolgen werden als Sulfatassimilation von den dissimilatorischen Prozessen, wie sie z.B. in Sulfatreduzierern, Thiobacilli oder phototrophen Bakterien ablaufen, unterschieden. Letztere sind gekennzeichnet durch einen großen Massenumsatz und die Beteiligung an energieliefernden Reaktionen der Zellen. Verglichen mit dem Massenumsatz der Schwefelverbindungen bei den dissimilatorischen Prozessen, sind die Umsatzraten bei der assimilatorischen Sulfatreduktion sehr bescheiden und entsprechend verhalten sich auch die Aktivitäten der beteiligten Enzyme. So enthält z.B. Thiobacillus denitrificans die an der dissimilatorischen Sulfidoxidation beteiligten Enzyme APS-Reduktase und ADP-Sulfurylase in Aktivitäten von etwa 0.5-1.0 Einheiten/mg Protein. Die Umsatzrate des an der Sulfatassimilation beteiligten Enzymes "PAPS-Reduktase" in auf Sulfat gezogenen Zellen von Salmonella typhimurium, Escherichia coli und Bacillus subtilis liegt um einige Zehnerpotenzen niedriger bei etwa 2×10^{-5} - 4×10^{-4} Einheiten/mg Protein (Pasternak et al., 1965; Jones-Mortimer et al., 1968; Kredich, 1971).

2. Assimilatorische Sulfatreduktion

Die Befähigung zur Nutzung von Sulfat als einziger Schwefelquelle schließt die Reaktionen der Sulfataufnahme, der Aktivierung und der Reduktion ein.

a) Sulfataufnahme

Die Sulfataufnahme in die Zelle ist ein durch ein Trägerprotein katalysierter aktiver Transport. Die aktive Aufnahme von Sulfat gegen einen Konzentrationsgradienten konnte in einer Anzahl von Organismen, darunter Chlorella, Neurospora, Penicillium, Aspergillus und Salmonella typhimurium nachgewiesen werden (siehe Siegel, 1975). Der K_m-Wert der Sulfatpermease liegt in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5} M. In Pilzen und Chlorella können auch Selena Molybdat und Chromat über das Sulfattransportsystem aufgenommen werden. Während in Pilzen und Chlorella das Transportsystem nicht reversibel ist, kann in Salmonella typhimurium der Transport in beide Richtungen erfolgen (Dreyfuss 1964). Freies intrazelluläres Sulfat reduziert die Aufnahme leicht, während intrazelluläre reduzierte Schwefelverbindungen, besonders Cystein und Methionin, die Sulfataufnahme stark herabsetzen.

b) Sulfataktivierung

Sulfat ist eine sehr stabile und wenig reaktive Verbindung, die für biochemische Reaktionen erst aktiviert werden muß. Die Aktivierung erfolgt in zwei Schritten. Die ATP Sulfurylase (ATP-Sulfat Adenylyltransferase, EC 2.7.7.4) katalysiert die Bildung von Adenylylsulfat (APS) :

$$ATP^{4-} + SO_4^{2-} + H^+ \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} APS^{2-} + PP_i^{3-}$$

Diese Reaktion ist energetisch sehr ungünstig und die Gleichgewichtslage ist nahezu vollständig auf der Seite von ATP und Sulfat ($K=(APS) \times (PP_i)/(ATP) \times (SO_4^{2-}) = 10^{-8}$, Robbins und Lipmann, 1958a).Sie wird "gezogen" durch den Umsatz von Pyrophosphat zu Phosphat durch anorganische Pyrophosphatase (Pyrophosphatphosphohydrolase, EC 3.6.11)

$$PP_i^{3-} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} 2\ P_i^{2-} + H^+$$

und einen weiteren aktivierenden Schritt, die Reaktion der APS-Kinase (ATP: Adenylylsulfat-3'-phosphotransferase, EC 2.7.1.25), die eine hohe Affinität zu APS hat :

$$APS^{2-} + ATP^{4-} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} PAPS^{4-} + ADP^{3-} + H^+$$

Auf Grund der $\Delta G_o'$-Werte für die Reaktion der ATP-Sulfurylase ($\Delta G_o' = 9.5$ kcal/mol) und der Pyrophosphatase ($\Delta G_o' = -4.5$ kcal/mol) kann für die Gesamtreaktion eine Gleichgewichtskonstante für die APS-Bildung von 10^{-4} M kalkuliert werden (Siegel, 1975).

Die Enzyme der sulfataktivierenden Schritte wurden in einer Reihe von Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Pflanzen nachgewiesen. Untersuchungen an angereicherter oder gereinigter ATP-Sulfurylase wurden an Pflanzen (Paynter und Anderson, 1974; Shaw und Anderson, 1974), an Hefen (Robbins und Lipmann, 1958a; Marx et al., 1974), an Penillium chrysogenum (Tweedie und Segel, 1971; Farley et al., 1976) und an Nitrobacter agilis (Varma und Nicholas, 1971a) durchgeführt. Gereinigte APS-Kinase-Präparate wurden aus Hefen (Robbins und Lipmann, 1958b) und Nitrobacter agilis (Varma und Nicholas, 1971b) untersucht.

Die Reaktionen der Sulfataufnahme und der Sulfataktivierung sind dem Weg des Sulfats in Sulfatester und dem reduktiven Weg gemeinsam und sind auch in tierischem Gewebe gefunden worden. Als Donator für die Sulfogruppe vieler organischer Sulfatester wurde PAPS nachgewiesen (De Meio, 1975).

c) Reduktion des aktivierten Sulfats

Während über die Reaktionen der Sulfataktivierung in verschiedenen sulfatassimilierenden Organismengruppen recht einheitliche Ergebnisse vorliegen, sind die Daten über die reduzierenden Reaktionen zum Teil widersprüchlich und in den einzelnen Organismengruppen unterschiedlich.

Die ursprünglich aufgestellte Hypothese, daß in der dissimilatorischen Sulfatreduktion APS über APS-Reduktase reduziert wird und daß jede assimilatorische Sulfatreduktion über PAPS mittels einer PAPS-Reduktase verläuft (Peck, 1961) wurde mit dem Befund hinfällig, daß Chlorella Sulfat über APS reduziert (Schmidt, 1972). Auf Grund der Tatsache, daß Hefe und Escherichia coli PAPS reduzieren, Pflanzen und verschiedene Algen aber APS, wurde die Vermutung geäußert, daß phototrophe Organismen APS und nichtphototrophe Organismen PAPS reduzieren (Tsang und Schiff, 1975).

Unklar ist auch die Frage, ob bei der Reduktion freies Sulfit und Sulfid auftreten oder ob die Reduktion über gebundene Zwischenprodukte wie Thiosulfon- und Thiosulfanverbindungen abläuft.

Am besten untersucht sind die Systeme in der Alge Chlorella, in Chloroplasten aus Spinatblättern und in Hefen. Auch bei einigen Enterobacteriaceae sind detaillierte Arbeiten über die Sulfitreduktase und über die Regulation der Sulfatreduktion veröffentlicht worden (siehe Siegel, 1975).

APS reduzierende Systeme

Die Systeme in Chlorella und Spinatchloroplasten sind einander sehr ähnlich. Da das Chlorella-System intensiver untersucht wurde, soll dieses im folgenden kurz skizziert werden :

Zellfreie Extrakte von Chlorella können sowohl APS als auch PAPS reduzieren. Es wurde eine APS-Sulfotransferase isoliert (Schmidt, 1972), die spezifisch APS umsetzt und in Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) S-Sulfoglutathion ($GS\text{-}SO_3^-$) bildet. PAPS wird von dem Enzym nicht um-

gesetzt. PAPS kann nur in Extrakten umgesetzt werden, die eine magnesiumabhängige 3'-Nukleotidase (3'-phosphoadenylylsulfat-3'-phosphohydrolase, EC 3.1.3.30) enthalten, die PAPS zu APS dephosphoryliert (Schmidt, 1972 ; Tsang und Schiff, 1976). Das tatsächlich reduzierte Nukleotid ist demnach APS.

Mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator können Extrakte aus Chlorella das GS-SO_3^- weiter zum Glutathionpersulfid (GS-SH) reduzieren. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, die Thiosulfonatreduktase, wurde von Schmidt (1973) angereichert.

In vivo wird die Sulfogruppe des APS wahrscheinlich nicht auf GSH, sondern auf die SH-Gruppe eines niedermolekularen, hitzestabilen Trägermoleküls übertragen, an dem sie weiterreduziert wird.

Eine Sulfitreduktase, die freies Sulfit umsetzt, ist ebenfalls in Chlorella vorhanden. Sie ist nicht mit der Thiosulfonatreduktase identisch (Schmidt und Schwenn, 1971). Mutanten, die keine Thiosulfonatreduktase haben, aber Sulfitreduktase-Aktivität besitzen, können nicht auf Sulfat als einziger Schwefelquelle wachsen. Daraus schließen Schmidt et al. (1974), daß die Reduktion über gebundene Zwischenstufen abläuft. Ein Schema der Reaktionen, die an der Sulfatassimilation in Chlorella beteiligt sind, ist in Abb. 1 nach einem Vorschlag von Schmidt (1973) dargestellt.

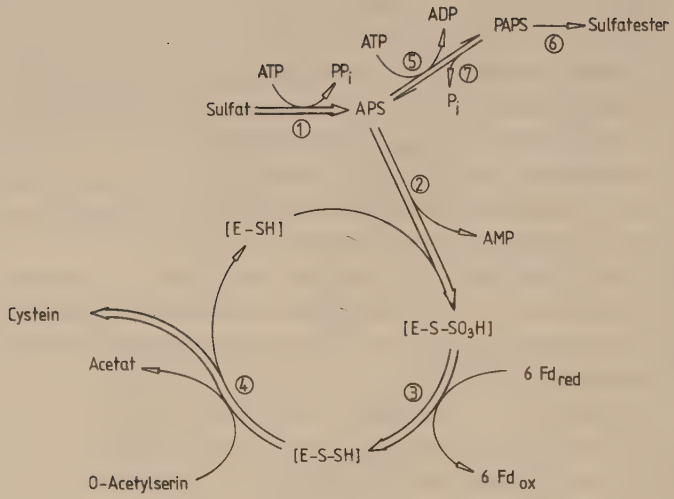

Abb. 1 : Sulfatreduktion in Chlorella
(modifiziert nach Schmidt, 1973)
1 : ATP-Sulfurylase, 2 : APS-Sulfotransferase,
3 : Thiosulfonatreduktase, 4 : O-Acetylserinsulf-
hydrylase, 5 : APS-Kinase, 6 : Sulfotransferasen,
7 : 3'-phosphoadenylylsulfat-3'-phosphohydrolase,
E = Enzym, Fd = Ferredoxin.

PAPS-reduzierende Systeme

Im Gegensatz zu dem pflanzlichen System ist in Hefe (Wilson et al., 1961) und in E. coli (Tsang und Schiff, 1975) PAPS das Substrat für die Reduktion.

In E. coli überträgt die Sulfotransferase die Sulfogruppe vom PAPS auf ein Trägermolekül, das nach Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung als Thioredoxin identifiziert wurde (Tsang und Schiff, 1976) und als Kofaktor für die

Sulfotransferase-Reaktion erforderlich war. Wie in Chlorella konnte auch in E. coli eine Thiosulfonatreduktase gefunden werden, die GS-SO_3^- zu GS-SH reduziert. In E. coli ist dieses Enzym jedoch nicht Ferredoxinabhängig, sondern benötigt NADPH und Magnesium-Ionen zur Aktivität. Anders als in Chlorella scheint in E. coli die Thiosulfonatreduktase mit der Sulfitreduktase identisch zu sein (Tsang und Schiff, 1976). Das Reaktionsschema der Sulfatreduktion für E. coli von Tsang und Schiff (1976) wurde für Abb. 2 etwas abgewandelt.

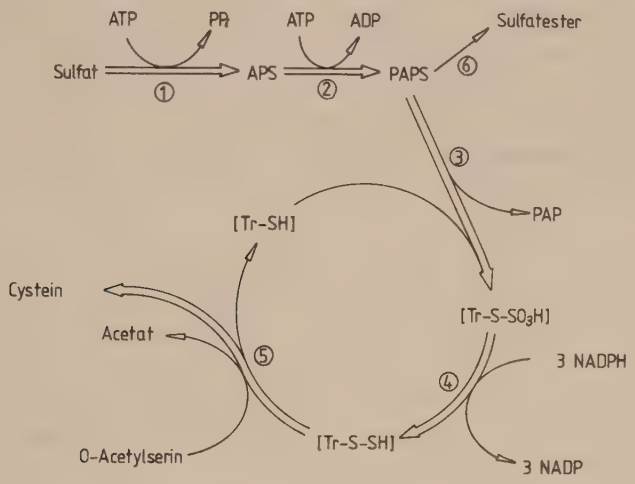

Abb. 2 : Sulfatreduktion in E. coli
(modifiziert nach Tsang und Schiff, 1976)
1 : ATP-Sulfurylase, 2 : APS-Kinase, 3 : PAPS-Sulfotransferase, 4 : Thiosulfonatreduktase, 5 : O-Acetylserinsulfhydrylase, 6 : Sulfotransferasen, Tr = Thioredoxin

Bereits 1961 konnte die Beteiligung von drei Proteinkomponenten an der Reduktion des PAPS zur Stufe des Sulfits in Hefe gezeigt werden (Wilson et al., 1961; Asahi et al.,

1961). Zwei Fraktionen ("A" und "B") sind hitzelabil, die dritte ("C") ist ein niedermolekulares, hitzestabiles Protein. Freies Sulfit tritt auch hier nicht auf (Torri und Bandurski, 1967). Die Sulfogruppe wird von Enzym "B" (PAPS-Sulfotransferase) auf einen Träger übertragen, an dem sie weiter bis zur Stufe des Sulfids reduziert wird. Der Träger ist nicht identisch mit Fraktion "C" (Wilson und Bierer, 1976). Nach erfolgter Reduktion wird das Sulfid auf O-Acetylserin übertragen. Der oxidierte Träger wird an Enzym "B" gebunden und von reduzierter Fraktion "C" reduziert. In dieser Form kann er eine neue Sulfogruppe empfangen. Die Funktion von Enzym "A" liegt in der Reduktion von Fraktion "C". Beide scheinen identisch zu sein mit Thioredoxin ("C") und Thioredoxinreduktase ("A") (NADPH-Thioredoxin (oxidiert) Oxidoreduktase, EC 1.6.4.5). Die Reaktionen sind in Abb. 3 zusammenfassend dargestellt (nach Wilson und Bierer, 1976).

d) Einbau des Schwefels in Cystein und Regulation

In einer großen Anzahl von Bakterien konnte bisher das Enzym O-Acetylserin-Sulfhydrylase (O-Acetyl-L-Serin Acetat Lyase (H_2S bindend), EC 4.2.998) nachgewiesen werden (Chambers und Trudinger, 1971) :

$$\text{O-Acetyl-L-Serin} + H_2S \longrightarrow \text{L-Cystein} + \text{Acetat}$$

Die Synthese von O-Acetylserin erfolgt vom Serin und wird von der Serin-Transacetylase katalysiert. O-Acetylserin wurde von Kredich und Tomkins (1966) als Intermediat der Cysteinbiosynthese erkannt. Es spielt bei der Regulation der Sulfatassimilation eine bedeutende Rolle. Bei Untersuchungen an E. coli und Salmonella typhimurium konnten Serintransacetylase und O-Acetylserin-Sulfhydrylase nachgewiesen werden. In beiden Bakterien ist nur die Synthese der O-Acetylserin-Sulfhydrylase, nicht die der Serin-Transacetylase, durch Cystein reprimiert. Cystein reprimiert ebenso die Synthese der Enzyme von Sulfataktivierung und Sulfatreduktion. Zur

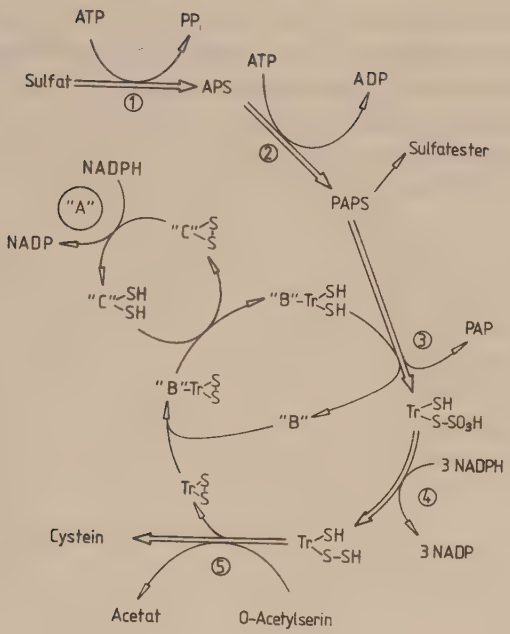

Abb. 3 : Sulfatreduktion in Hefe
(modifiziert nach Wilson und Bierer, 1976)
1: ATP-Sulfurylase, 2: APS-Kinase, 3: PAPS-Sulfotransferase, 4: Thiosulfonatreduktase, 5: O-Acetylserinsulfhydrylase, "B" = Sulfotransferase, "A" = "Fraktion C-Reduktase", "C" = Fraktion C = hitzestabiler Proteinkofaktor, Tr = Träger.

Induktion dieser Enzyme führt Wachstum auf O-Acetylserin (Pasternak, 1962; Jones-Mortimer et al., 1968; Kredich, 1971). Bei Schwefelmangel, angezeigt durch eine niedrige Cysteinkonzentration und eine hohe O-Acetylserinkonzentration in der Zelle, wird folglich die Synthese des sulfatreduzierenden Enzymsystems angeregt. Bei Schwefelüberschuß wird dieses System durch die erhöhte Cysteinkonzentration reprimiert.

3. Schwefelstoffwechsel phototropher Bakterien

Phototrophe Bakterien spielen in der Natur eine bedeutende Rolle am Umsatz von Schwefelverbindungen. Alle Chromatiaceae und Chlorobiaceae haben die Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfidoxidation. Sulfid ist ihr wichtigster photosynthetischer Elektronendonator, und die Vertreter beider Familien kommen charakteristischerweise und zum Teil ausschließlich an sulfidhaltigen Standorten vor. Chlorobium-Arten oxidieren bei leicht sauren pH-Werten Sulfid zu extrazellulärem Elementarschwefel und weiter zu Sulfat; die Chromatiaceae, mit Ausnahme von Ectothiorhodospira, lagern den Elementarschwefel in der Zelle ab und bevorzugen einen leicht alkalischen pH-Bereich; das Genus Ectothiorhodospira oxidiert Sulfid wie die Chlorobiaceae zunächst zu Elementarschwefel, der ins Medium ausgeschieden wird, bevorzugt jedoch alkalische pH-Werte über 7.5 bis 8.5; auch Chloroflexus aurantiacus vermag Sulfid zu oxidieren (Castenholz, 1973; Madigan und Brock, 1975). Von den Rhodospirillaceae nahm man lange an, daß sie Sulfid nicht als photosynthetischen Elektronendonator verwerten können. Einige Vertreter vermögen jedoch Sulfid zu oxidieren. Rhodospirillum rubrum, Rhodopseudomonas capsulata und Rhodopseudomonas sphaeroides sind nur zur Oxidation bis zur Stufe des Elementarschwefels fähig. Rhodopseudomonas palustris und Rhodopseudomonas sulfidophila oxidieren Sulfid direkt zu Sulfat, nicht über die Bildung von Elementarschwefel. Rhodomicrobium vannielii bildet als Oxidationsprodukt ausschließlich Tetrathionat, kein Sulfat und keinen Elementarschwefel (Hansen, 1974; Hansen und von Gemerden, 1972; Hansen und Veldkamp, 1973).

Solange den Zellen reduzierte Schwefelverbindungen angeboten werden, ist zu erwarten, daß diese nicht nur für energieliefernde dissimilatorische Prozesse benutzt werden, sondern auch den viel geringeren assimilatorischen Bedarf decken. Bei Organismen, die sich optimal an sulfidhaltige Standorte angepaßt haben, ist sogar zu erwarten, daß sie

im Zuge dieser Anpassung die Fähigkeit verloren haben, oxidierte Schwefelverbindungen zu reduzieren und somit auf reduzierte Schwefelverbindungen angewiesen sind. Organismen, deren Evolution stets in sulfidhaltigen Standorten vor sich ging, haben die Fähigkeit zur assimilatorischen Sulfatreduktion möglicherweise nie erworben.

Tatsächlich fehlt allen Chlorobiaceae und den meisten Chromatiaceae die Fähigkeit, Sulfat zu reduzieren. Nur einige kleine Chromatium-Arten, die auch photoheterotroph wachsen können, sowie Ectothiorhodospira mobilis und einige Stämme von Thiocapsa roseopersicina und Thiocystis violacea können mit Sulfat als einziger Schwefelquelle wachsen. Einige von Lippert (1967) getestete Stämme von Chlorobium limicola können mit H_2 als Elektronendonator Cystein als Schwefelquelle assimilieren; Sulfat kann nicht reduziert werden, jedoch scheint dauerhaftes Wachstum unter diesen Bedingungen nur in Gegenwart von Schwefel auf der Oxidationsstufe des Sulfats möglich zu sein. Dieses deutet auf die Unfähigkeit hin, den Cysteinschwefel zur Stufe des Sulfats zu oxidieren, sowie auf den Bedarf an Sulfat möglicherweise für die Synthese von Sulfolipiden.

Von den Rhodospirillaceae, deren Lebensweise normalerweise photoheterotroph ist und die seltener in sulfidhaltigen Standorten gefunden werden, können mit wenigen Ausnahmen alle Arten Sulfat als einzige Schwefelquelle verwerten, also auch bis zur Stufe des Sulfids reduzieren. Rps. sulfoviridis (Keppen und Gorlenko, 1975) und Rps. spec. Stamm 51 (Hansen, 1974) sowie Rps. spec. 6 II (siehe Ergebnisse V.1) können nicht auf Sulfat als einziger Schwefelquelle wachsen. Rps. globiformis kann nur beschränkt auf Sulfat als einziger Schwefelquelle wachsen (Pfennig, 1974; Imhoff, im Druck; Ergebnisse V.1).

Über die enzymatischen Reaktionen der Sulfatreduktion durch phototrophe Bakterien liegen zu Beginn dieser Arbeit nur dürftige Untersuchungen vor. Die Bildung von PAPS sowie der Einbau des ^{35}S-Schwefels vom Sulfat in Cystein wurde in

R. rubrum nachgewiesen (Ibanez und Lindstrom, 1959, 1962). Auch in Chromatium vinosum und Thiocapsa roseopersicina wird nach Wachstum auf ^{35}S-Sulfat Radioaktivität in den schwefelhaltigen Aminosäuren gefunden (Thiele, 1966). Diese Experimente bestätigen die aus Wachstumsversuchen gezogenen Schlüsse, daß Sulfat als einzige Schwefelquelle verwertet werden kann, sagen aber nichts über den Weg oder die an der Sulfatreduktion beteiligten Enzyme aus.

Hinweise auf eine Sulfitreduktase in Extrakten aus Rps. viridis, Rps. gelatinosa, Rm. vannielii, R. rubrum sowie Chromatium vinosum und Chlorobium limicola stammen aus Screening-Experimenten von Peck et al. (1974). Die Aktivitäten finden sich im löslichen Überstand der Ultrazentrifugation und sind abhängig von reduziertem Methylviologen; NADPH ist kein Elektronendonator. Im übrigen lassen die in dieser Arbeit dargestellten Daten viel Spielraum für Spekulationen, geben aber wenig Möglichkeit zu klarer Interpretation. Für die Beteiligung an dissimilatorischen Prozessen sind die Aktivitäten den Autoren zu gering; dagegen spricht auch ihre Präsenz in Organismen, die zur Sulfidoxidation nicht befähigt sind. Gegen eine Beteiligung an der assimilatorischen Sulfatreduktion, die die Autoren für wahrscheinlich halten, spricht die hohe Aktivität in Chlorobium limicola, das Sulfat nicht reduzieren kann, und eine Steigerung der Aktivität in Chromatium vinosum unter autotropher gegenüber heterotropher Anzucht. Im Hinblick auf die Befunde in Chromatium vinosum sind die Ergebnisse von Schedel et al. (1979) interessant. Sie fanden, daß eine Sulfitreduktase nur in autotroph mit Sulfid als Elektronendonator gewachsenen Zellen vorhanden ist, und zwar in einer Aktivität von 4 mEinheiten/mg Protein.

Die Verhältnisse liegen ähnlich wie in Thiobacillus denitrificans, dessen Sulfitreduktase im Rohextrakt eine spezifische Aktivität von weniger als 10 mEinheiten/mg Protein hatte, aber mehr als 1% des Gesamtproteins ausmachte (Schedel und Trüper, 1979).

Die Synthese des Cysteins erfolgt in allen untersuchten phototrophen Bakterien über die Reaktion der O-Acetylserin-

Sulfhydrylase (Chambers und Trudinger, 1971; Hensel und Trüper, 1976) :

$$\text{O-Acetylserin} + H_2S \longrightarrow \text{Cystein} + \text{Acetat}$$

Die Aktivität einer S-Sulfocysteinsynthase, die eine Reaktion von O-Acetylserin mit Thiosulfat katalysiert, wurde nur in R. tenue und in Rps. gelatinosa gefunden (Hensel und Trüper, 1976).

Eine zusammenfassende Übersicht über den Schwefelstoffwechsel der phototrophen Bakterien wird von Trüper (1978) gegeben.

4. Ziele dieser Arbeit

Da über die Assimilation des Sulfats in phototrophen Bakterien bisher keine detaillierten Untersuchungen vorliegen sowie weder über die Reaktionsfolge oder die Regulation noch über Eigenschaften einzelner Enzyme Daten vorliegen, und zur gleichen Zeit Arbeiten über die Enzyme der Cysteinsynthese (Hensel, 1979) und der Sulfataktivierung (Cooper, 1979) durchgeführt wurden, sollten in dieser Arbeit erste Einblicke in die Reaktionen der reduzierenden Enzyme gewonnen werden. Dabei sollte vor allem geklärt werden, welches Schwefelnukleotid (APS oder PAPS) das Substrat für die Thiol-Sulfotransferase* ist, und ob ein Protein-Kofaktor für diese Reaktion erforderlich ist. Eine Voraussetzung für diese Arbeiten war die Synthese der Enzymsubstrate APS und PAPS (bzw. $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$). Beschriebene Methoden waren entweder zu zeitaufwendig oder lieferten zu schlechte Ausbeuten. Erstes Ziel dieser Arbeit mußte daher eine Optimierung der Synthese- und Reinigungsverfahren dieser Nukleotide sein.

Von großem Interesse war ferner die Regulation der an der Sulfatassimilation beteiligten Enzyme einschließlich des Sulfattransports. Es sollte der Einfluß von reduzierten Schwefelverbindungen und O-Acetylserin auf die Enzymsynthese untersucht werden. Das Regulationsverhalten sollte gleichzeitig eine Beteiligung der getesteten Enzyme an der Reduktion des Sulfats bestätigen.

Die am sulfatreduzierenden Enzymsystem in verschiedenen Rhodospirillaceae gewonnenen Daten sollen miteinander und mit den bekannten Daten aus anderen Organismen verglichen werden.

*Mit der Annahme, daß das Reaktionsprodukt dieses Enzyms Sulfit ist, wird es in der Literatur als Reduktase bezeichnet. Die Bestätigung eines Reaktionsweges über thiolgebundene Zwischenstufen führte zu einer Umbenennung des

Enzyms in eine Sulfotransferase. Die korrekte Bezeichnung ist APS bzw. PAPS: Thiolsulfotransferase. In dieser Arbeit wird das Enzym einfach als Sulfotransferase bezeichnet; bei Literaturzitaten wird die dort verwendete Bezeichnung benutzt

Die von diesen Enzymen katalysierte Reaktion unterscheidet sich von den bekannten Sulfotransferasen, in denen die Sulfogruppe über Sauerstoff am Empfänger gebunden wird, durch eine Änderung der Oxidationsstufe des Schwefels.

Ähnlich verhält es sich mit dem in der Cysteinbiosynthese folgenden Enzym. Es wird als Sulfitreduktase bezeichnet, wenn "freies Sulfit" als Substrat angenommen wird und als Thiosulfonatreduktase, wenn es "gebundenes Sulfit" ist.

MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Die folgenden Organismen wurden in dieser Arbeit zu Tests oder enzymatischen Synthesen verwendet :

Rps. capsulata Kb_1 (DSM 155)
Rps. sphaeroides 17023 (DSM 158)
Rps. sulfidophila W_4 (DSM 1374)
Rps. sulfidophila 1999 (BN 196)
Rps. sulfidophila 982 (BN 191)
Rps. sulfoviridis P_1
Rps. viridis BN 170
Rps. palustris $1a_1$
Rps. gelatinosa DSM 149
Rps. gelatinosa BN 151
Rps. acidophila 7050 (DSM 137)
Rps. globiformis 7950 (DSM 161)
Rps. spec. 985 (BN 126)
Rps. spec. 992 (BN 125)
Rps. spec. 51
Rps. spec. 6II (BN 189/2)
R. rubrum HA (DSM 107)
R. rubrum S_1 (DSM 467)
R. tenue BN 230
R. fulvum BN 211
R. molischianum DSM 120
R. photometricum DSM 122
Rm. vannielii 17100 (DSM 162)
Rc. purpureus 6770 (DSM 168)

E. coli K_{12}
Serratia marcescens
Paracoccus denitrificans DSM 145
Pseudomonas aeruginosa
Bacillus subtilis DSM 347
Alkaligenes eutrophus H_{16}
Sarcina lutea DSM 348

Staphylococcus aureus DSM 349
Thiobacillus denitrificans RT
Bäckerhefe
Saccharomyces carlsbergensis ATCC 9080 (DSM 7042

Alle Stämme phototropher Bakterien wurden der Sammlung von phototrophen Bakterien des Instituts für Mikrobiologie in Bonn entnommen. Sie wurden zum großen Teil von Prof. Pfennig zur Verfügung gestellt und, soweit eine Bonner Sammlungsnummer (BN) angegeben ist, selbst isoliert (Imhoff, 1976; Imhoff und Trüper, 1976). Rps. sulfidophila W_4 und Rps. spec. 51 wurden von T.A.Hansen (Groningen) erhalten. Die chemotrophen Organismen wurden alle über Mitarbeiter des Instituts erhalten, Serratia marcescens und Pseudomonas aeruginosa von der Abteilung für Landwirtschaftliche Mikrobiologie. Zellen von Thiobacillus denitrificans wurden von der Firma Merck angezogen, die Bäckerhefe von der Firma Hefe-Arck (Bonn-Duisdorf).

2. Kulturbedingungen

a) Medien

Wenn nicht anders angegeben wurden alle phototrophen Bakterien in dem folgenden Medium (AT) angezogen, das in 1 l folgende Bestandteile enthielt :
1 ml Vitaminlösung VA, 1 ml Spurenelementlösung SLA, 1 g KH_2PO_4, 0.2 g $MgCl_2$ x 6 H_2O, 0.1 g $CaCl_2$ x 2 H_2O, 0.5 g NH_4Cl, 3 g $NaHCO_3$, 0.5 g Na-Ascorbat, 10 ml Na-Malat (1 M), 5 ml Na_2SO_4 (1 M).

Der pH-Wert wurde auf 6.9-7.1 eingestellt. Die marinen Stämme, Rps. sulfidophila W_4, 1999 und 982 und Rps. spec. BN 126 erhielten zusätzlich 3% NaCl im Medium. Für Rps. acidophila betrug der pH-Wert des Mediums 5.1. Zur Anzucht von Rc. purpureus enthielt das Medium zusätzlich 0.05% Na-Acetat und 0.1 mg Vitamin B_{12} je 1 l (Stammlösung

0.5 mg/10 ml). In die Stammkulturen dieses Stammes wurde außerdem 0.05% Hefeextrakt zugegeben.

Die Spurenelementlösung ("SLA") enthielt in 1 l : 250 mg $CoCl_2$ x 6 H_2O, 10 mg $NiCl_2$ x 6 H_2O, 10 mg $CuCl_2$ x 2 H_2O, 70 mg $MnCl_2$ x 4 H_2O, 100 mg $ZnCl_2$, 500 mg H_3BO_3, 30 mg Na_2MoO_4 x 2 H_2O, 10 mg Na_2SeO_3 x 5 H_2O, 1.8 g $FeCl_2$ x 4 H_2O. Ihr pH-Wert wurde mit HCl auf 2-3 eingestellt.

Die Vitaminlösung ("VA") enthielt in 500 ml : 50 mg Biotin, 175 mg Nicotinsäureamid, 150 mg Thiamindichlorid, 100 mg p-Aminobenzoesäure, 50 mg Pyridoxolhydrochlorid, 50 mg Ca-Panthotenat, 25 mg Vitamin B_{12}.

Rps. globiformis wurde auf dem folgenden Medium angezogen (nach Pfennig, 1974, abgeändert) : 1 ml Vitaminlösung VA, 1 ml Spurenelementlösung SLA, 0.4 g NH_4Cl, 0.5 g KH_2PO_4, 0.4 g $MgCl_2$ x 6 H_2O, 0.05 g $CaCl_2$ x 2 H_2O, 1.5 g Mannit, 0.5 g Na-Gluconat. Als Schwefelquelle diente entweder Na_2SO_4 (0.1 mM) oder $Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O (0.02%). Der pH-Wert des Mediums betrug 4.9-5.0.

Alle Medien für phototrophe Bakterien wurden durch Seitz-Filter sterilfiltriert.

Medium für Paracoccus denitrificans : 1 ml SLA, 1 g NH_4Cl, 0.2 g $MgCl_2$ x 6 H_2O, 0.1 g $CaCl_2$ x 2 H_2O, 2.3 g KH_2PO_4, 2.9 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O, 1 g $NaHCO_3$, 5 g Glucose, 5 mM Na_2SO_4; pH 7.0.

Medium für Alkaligenes eutrophus : 1 ml SLA, 1 g NH_4Cl, 0.2 g $MgCl_2$ x 6 H_2O, 0.01 g $CaCl_2$ x H_2O, 1.5 g KH_2PO_4, 9 g Na_2HPO_4 x 12 H_2O, 50 mg $NH_4Fe(SO_4)_2$ x 12 H_2O, 5 g Na-Lactat; pH 7.0.

Alle anderen chemotrophen Bakterien wurden auf dem folgenden Medium angezogen : 1 ml VA, 1 ml SLA, 0.5 g $MgCl_2$ x 6 H_2O, 0.2 g $CaCl_2$ x 2 H_2O, 1.4 g Na_2SO_4 (10 mM), 4 g $(NH_4)_2HPO_4$, 20 g Glucose; pH 6.8.

Stammkulturen wurden auf HPG-Medium (0.5% Hefeextrakt, 0.5% Pepton, 0.1% Glucose), Vor- und Hauptkulturen auf dem oben genannten Medium angezogen.

b) Zellanzucht

Stammkulturen aller phototrophen Bakterien wurden in den angegebenen Medien in 50 ml Schraubverschlußflaschen unter anaeroben Bedingungen bei 28°C und 800-1000 Lux angezogen. Experimente zur Sulfataufnahme und die Verwertung verschiedener Schwefelquellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Die Anzucht kleiner Zellmengen von weniger als 10 g Feuchtgewicht erfolgte unter den gleichen Bedingungen in runden 1 l Schraubverschlußflaschen.

Zellmaterial für Enzymanreicherungen wurde im Lichtfermenter F III (Firma Hebell) bei 5000-10000 Lux, 200-300 Umdrehungen/min, 28°C und nach Möglichkeit unter pH-Kontrolle und leichter N_2-Begasung angezogen. Die Zellausbeuten betrugen bis zu 5 g/l.

Wachstumsversuche zur Derepression wurden ebenfalls im Fermenter F III durchgeführt. Die Vorinkubation auf Cystein erfolgte in einem "Mantelfermenter" (Sonderanfertigung der Firma Fastnacht nach eigenen Angaben). Das Inkubationsgefäß mit einem 1 l - Volumen war von einem Wassermantel umgeben, der mit Hilfe eines Laborthermostaten mit Pumpe zur Temperierung diente. Die Kultur wurde mit einem Magnetrührer gerührt und mit N_2 begast. Die Messung von Temperatur, pH sowie eines dritten Parameters und Begasung über eine Frittesowie sterile Probenentnahme über einen entsprechenden Ansatzstutzen sind möglich.

Die Anzucht aller aeroben Organismen erfolgte in 1 l Erlenmeyerkolben bei 30°C im Inkubationsschüttler.

3. Herstellung zellfreier Extrakte

Alle phototrophen Bakterien wurden, wenn nicht anders angegeben, in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit Zusatz von 1 mM DTE durch zweimaliges Passieren der French-Presse aufgeschlossen. 1 g Zellfeuchtgewicht wurde in 2 ml Puffer suspendiert und mit wenigen µg DNase versetzt. Ganze Zellen und grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (Sorvall RC 2B, SS 34-Rotor, 10000 U/min, 10 min). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde ultrazentrifugiert (Beckman L5-50, 60Ti-Rotor, 45000 U/min, 90 min). Der Überstand aus der Sorvall-Zentrifugation wurde als Rohextrakt bezeichnet, der klare Überstand der Ultrazentrifugation als lösliches Protein und das einmal gewaschene Pellet nach der zweiten Ultrazentrifugation als Chromatophoren.

4. Proteinbestimmung

a) an Zellextrakten nach Beisenherz et al. (1953):

In ein Zentrifugenglas wurden 0.2 ml Extrakt mit 0.6 ml destilliertes Wasser und 0.2 ml 3 M TCA pipettiert. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und bei phototrophen Bakterien wurde der Rückstand zweimal mit je 3 ml Aceton extrahiert und erneut abzentrifugiert. Der Rückstand wurde in 3 ml H_2O aufgenommen, mit 3 ml Reagenzlösung gut durchmischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reagenzlösung enthielt in 1 l :

9 g K-Na-Tartrat
3 g $CuSO_4$ x 5 H_2O
5 g KJ
8 g NaOH

Die Extinktion bei 546 nm wurde gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Eine Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin erstellt. Bei nicht phototrophen Organismen entfiel die Extraktion mit Aceton.

b) An gereinigten Proteinfraktionen wurde die Methode von Warburg und Christian (1941) zur Bestimmung des Proteingehaltes benutzt. Es wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen und die Proteinkonzentration (C_p) in mg/ml aus folgender Beziehung errechnet :

$$C_p = 1.55 \times E_{280} - 0.76 \times E_{260}$$

c) Proteinbestimmung an ganzen Zellen erfolgte nach Schmidt et al. (1963) :

Die Zellen wurden abzentrifugiert, phototrophe Bakterien anschließend dreimal mit je 3 ml Aceton extrahiert. Das Sediment wurde in 4 ml H_2O und 0.4 ml 16% NaOH aufgenommen und 5 min gekocht. Nach Abkühlung wurden 1.6 ml der unter a) angegebenen Reagenzlösung zugefügt, 30 min bei 37°C inkubiert und nach der Zentrifugation die Extinktion bei 546 nm gemessen.

5. Enzymtests

a) ATP-Sulfurylase

ATP-Sulfurylase wurde mit Molybdat als Substrat gemessen (nach Wilson und Bandurski, 1958). Die Testkonzentrationen betrugen 150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$, 3 mM $MnCl_2 \times 4\ H_2O$, 20 mM $MgCl_2 \times 6\ H_2O$, 20 mM ATP, 1 E PPase/ml; mit Protein und H_2O wurde auf 1 ml ergänzt.

Der Ansatz wurde 20 min bei 30°C inkubiert, durch kurzes Kochen abgestoppt, im Eis abgekühlt und klarzentrifugiert. Als Blindwert wurde jeweils ein molydatfreier Ansatz gemessen. Im klaren Überstand wurde die Phosphatkonzentration bestimmt. Der Umsatz von Molybdat entspricht dem halben Phosphatumsatz.

b) APS-Kinase

Das Enzym wurde im löslichen Protein mit radioaktivem $AP^{35}S$ als Substrat gemessen. Die Konzentrationen im Test-

ansatz waren: 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 100 mM Na_2SO_4, 10 mM ATP, 0.1 mM $AP^{35}S$ (20000-50000 cpm/nmol); mit Protein und H_2O wurde auf 1 ml ergänzt. Der Extrakt wurde je nach Aktivität 1-10 min bei 30°C inkubiert und durch kurzes Kochen abgestoppt. Der im Eis gekühlte Ansatz wurde zur Trennung von $^{35}SO_4^{2-}$, $AP^{35}S$, $PAP^{35}S$ auf kleine Säulen (Durchmesser 0.8 cm, Länge 13 cm) mit Sephadex A-25 aufgetragen. Die Säulen waren mit 300 mM Tris-HCl, pH 7.6, äquilibriert und wurden eluiert mit 30 ml 300 mM Tris-HCl, 30 ml 400 mM Tris-HCl und 20 ml 1 M Tris-HCl mit dem gleichen pH-Wert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und die Radioaktivität darin gemessen. Geeicht wurden die Säulen mit $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$. Die Rate der $PAP^{35}S$-Bildung wurde aus der spezifischen Aktivität des eingesetzten $AP^{35}S$ und der gebildeten Menge an radioaktivem $PAP^{35}S$ errechnet.

c) Thiol-Sulfotransferase

In diesem Test wurde die Reaktion von $^{35}SO_4^{2-}$, $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$ zu säurelabilem $^{35}SO_3^{2-}$ gemessen (Schmidt, 1972). Die Konzentrationen im Standardtest betragen in einem Gesamtvolumen von 1 ml: 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM DTE, 10 mM $MgCl_2$ x 6 H_2O, 100 mM Na_2SO_4, 1-10 mg Protein; als radioaktive Substrate wurden 0.1 mM $AP^{35}S$ oder $PAP^{35}S$ oder 20 mM $^{35}SO_4^{2-}$ eingesetzt. Als Zusätze wurden je nach Angabe 10 mM ATP, 1 mM $AP^{32}S$ oder $PAP^{32}S$ und 20 µl des aus Spinat isolierten Faktors (Thioredoxinpräparat) zugesetzt. Der Testansatz wurde 1 h unter N_2 bei 37°C inkubiert und anschließend im Eisbad gestoppt. Mit Pasteurpipetten wurde der Ansatz quantitativ in Convay-Schalen überführt und mit 1 ml 1 N HCl angesäuert. Um eine quantitative Destillation zu erreichen, wurden je Ansatz 0.1 nmol Na_2SO_3 zugegeben. Flüchtiges $^{35}SO_2$ wurde im zentralen Teil der Schale in 1 ml 1 M Triäthanolamin aufgefangen. Zur vollständigen Destillation mußten die Schalen nach dem Ansäuern mindestens 4 h stehen. Danach wurden 0.5 ml des TÄA mit 5 ml Szintillator (Lumagel, Baker Chemicals, Holland) gemischt und im Szin-

tillationszähler (Beckman, Typ LS-230) die Zählrate gemessen. Aus der Zählrate und der spezifischen Aktivität der eingesetzten Schwefelverbindung wurde die Menge des gebildeten $^{35}SO_3^{2-}$ errechnet. Um mögliche Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurden die Tests mit dem löslichen Protein direkt nach der Ultrazentrifugation, undialysiert und stets am gleichen Tag des Zellaufschlusses, durchgeführt.

d) Thiosulfonatreduktase

Der Thiosulfonatreduktase-Test wurde mit reduziertem Methylviologen (MV) als Elektronendonator getestet. MV wurde mit Dithionit reduziert. Der Testansatz war 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM Dithionit (Stammlösung: 250 mg $Na_2S_2O_4$ und 250 mg $NaHCO_3$ in 10 ml H_2O gelöst) und 1 mM MV; mit Protein und H_2O wurde auf 1 ml ergänzt. Der Test wurde 1 h unter N_2 bei 30°C inkubiert. Sulfid wurde anschließend in Convay-Schalen durch Zugabe von 1 ml 1 N HCl zum gesamten Testansatz ausgetrieben und im Zentralgefäß in Zn-Acetat absorbiert. Dazu wurde ein Filterpapier (3 x 1 cm) mit 0.1 ml 10% Zn-Acetat getränkt. Nach Abschluß der "Destillation" wurde das Filterpapier zur Sulfidbestimmung in ein Zentrifugenglas mit Schraubverschluß überführt.

radioaktiver Thiosulfonatreduktase-Test:
Dieser Testansatz hatte folgende Konzentrationen: 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM $Na_2S_2O_4$, 1 mM MV, 10 mM DTE, 0.1 mM $AP^{35}S$ oder $PAP^{35}S$, 10 µl Spinatfaktor/ml; mit Protein und H_2O wurde auf 1 ml ergänzt. Die Inkubation erfolgte wie beim Test ohne radioaktive Nukleotide. Zur Bestimmung der Aktivität wurde der Ansatz in Convay-Schalen überführt, 0.1 ml 200 mM Na_2S x 9 H_2O zugefügt und mit 1 ml 1 N HCl angesäuert. Flüchtiges H_2S wurde im Zentralteil in 1 ml 1 M Triäthanolamin aufgefangen. Die Radioaktivität im Triäthanolamin wurde bestimmt.

6. Anreicherung von Kofaktoren für die Sulfotransferase

a) aus Spinat (in Anlehnung an Buchanan et al., 1971)

Frischer Spinat wird mit dem Mixer zerkleinert und durch ein Leinentuch ausgepreßt. Der Saft wird mit 1 N HCl auf pH 2.0 angesäuert und abzentrifugiert. Das Pellet wird verworfen. Der Überstand wird mit 1 M Tris-HCl, pH 8.0, neutralisiert und mit $(NH_4)_2SO_4$ bis zu 50% Sättigung versetzt. Nach Zentrifugation wird zum Überstand bis zu 90% Sättigung $(NH_4)_2SO_4$ zugegeben, und das Sediment dieser Fällung wird in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, aufgenommen. Zu dieser Lösung wird bis zu 75% Aceton (von -20°C) zugegeben und 1 h stehengelassen (bei -20°C). Das Präzipitat wird abzentrifugiert, in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Das dialysierte Protein wird über eine Sephadex G-50-Säule gegeben und im Eluat auf Grund der Aktivitätssteigerung der PAPS-Sulfotransferase nachgewiesen. Die aktivierenden Fraktionen wurden vereinigt und als Spinatfaktor in die Sulfotransferase-Tests eingesetzt. Dieser Spinatfaktor war frei von störenden Enzymaktivitäten und enthielt etwa 20 verschiedene Proteine, wie durch präparative isoelektrische Fokussierung mit 50 ml dieses Präparats im pH-Bereich von 2.0-4.0 (Servalyt) nachgewiesen wurde. In angereicherten Sulfotransferase-Präparaten wurde auch dieser nachgereinigter Spinatfaktor eingesetzt.

b) aus E. coli und Hefe

Extrakte von E. coli K_{12}, aerob mit Sulfat als einziger Schwefelquelle gewachsen, wurden nach der Ultrazentrifugation 5 min gekocht und anschließend über Sephadex G-50 entsalzen. Die Fraktionen, die eine Aktivitätssteigerung der PAPS-Sulfotransferase bewirkten, wurden gesammelt und als "Faktor" aus E. coli für weitere Tests verwendet. Eine Säurefällung bis pH 2.0 und $(NH_4)_2SO_4$-Fällung bis zu 70% führten zu keiner weiteren Anreicherung.

Mit frischen oder eingefrorenen Zellen von Bäckerhefe wurde zur Anreicherung eines aktivierenden Faktors wie bei E. coli verfahren.

7. Chemische Bestimmungsmethoden

a) Phosphatbestimmung (nach Taussky und Shorr, 1953) :

Als Stammlösung zur Herstellung der Reagenzlösung wurden 50 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ x 4 H_2O in 400 ml 10 N H_2SO_4 gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die Reagenzlösung wird hergestellt, indem 2.5 g $FeSO_4$ x 7 H_2O in 10 ml der Stammlösung gelöst werden und auf 50 ml aufgefüllt wird. Diese Lösung muß täglich frisch angesetzt und dunkel gehalten werden. Zum Testansatz werden 0.5 ml 10% TCA, 0.5 ml Probe (u.U. mit bidestilliertem H_2O verdünnt) und 0.5 ml Reagenzlösung pipettiert, gut durchmischt und nach 5 min wird die Extinktion bei 578 nm gegen einen Leerwert gemessen. Alle Lösungen werden mit bidistilliertem H_2O angesetzt.

b) Sulfidbestimmung (nach Pachmayr, 1960) :

Sulfid wurde als Methylenblau bestimmt. Die Methode ist bereits im Detail beschrieben (Imhoff, 1976). Um die Empfindlichkeit des Nachweises zu steigern, wurde das Testvolumen bei gleichbleibenden Reagenzkonzentrationen von 20 ml auf 2 ml reduziert. Unter diesen Testbedingungen haben 6 nmol S^{2-} bei 668 nm eine Extinktion von 0.1.

8. Nachweis von Nukleotiden

Zum Nachweis von $AP^{35}S$, $AP^{32}S$, $PAP^{35}S$ und $PAP^{32}S$ sowie anderen Nukleotiden diente neben der charakteristischen UV-Absorption bei 259 nm bei den radioaktiv markierten Verbindungen auch der Zerfall von ^{35}S-Schwefel. Zum sicheren

qualitativen Nachweis wurden, neben ihrem Elutionsverhalten auf den Ionenaustauschsäulen, die R_f-Werte in der Dünnschichtchromatographie und die Laufstrecken in der Hochspannungselektrophorese herangezogen.

a) Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Nano-DC-Platten der Firma Merck (HPTLC-Fertigplatten mit Kieselgel 60 F_{254}, 10 x 10 cm) und einem Laufmittel mit Isopropanol/NH_3/H_2O = 6/3/1. Aufgetragen wurden zwischen 1-2.5 µl. Der Nachweis der Nukleotide erfolgte im UV-Licht bei 254 nm. Es konnte so noch gut 1 nmol der Nukleotide nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Radioaktivität wurden die entsprechenden Zonen ausgekratzt, in 0.5 ml H_2O suspendiert, mit 5 ml Szintillator vermischt und im Szintillationszähler gezählt. Die R_f-Werte waren für AMP 0.36, für ADP 0.21, für ATP 0.14, für PAPS 0.47, für APS 0.62, für Adenosin 0.78 und für PAP 0.23.

b) Hochspannungselektrophorese

Die Hochspannungselektrophorese erfolgte mit dem Camag-Hochspannungselektrophorese-System. Als Puffersystem wurde 25 mM Citratpuffer, pH 5.8, verwendet. Das Elektrophoresepapier wurde mit Puffer getränkt und der Pufferüberschuß mit Fließpapier abgesaugt. Das Papier wurde auf die Kühlfläche der vorbereiteten Elektrophoresezelle aufgelegt, und es wurden jeweils 5 µl Probe aufgetragen. Die Laufzeit betrug 15 min bei 4000 Volt. Als Referenznukleotide wurden jeweils ATP und AMP aufgetragen. Am schnellsten wandert PAPS, gefolgt von ATP, PAP, APS, ADP, AMP. Sulfat legt etwa die doppelte Laufstrecke des PAPS zurück.

9. Präparative isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem LKB Multiphor 2117 und dem LKB Power Supply 2103 nach Anleitungen der Firma LKB durchgeführt.

Sechs Elektrodenstreifen wurden mit 2%iger Lösung der Trägerampholyten in dem gewählten pH-Bereich getränkt und in dreifacher Lage auf die für den Trennungslauf vorgesehenen Glasplatte aufgelegt. Anschließend wurden 4 g Ultrodex (Firma LKB) in 100 ml dieser Lösung suspendiert und auf die Glasplatte aufgegossen. Das Gel wurde in exakt waagerechter Lage mit einem Fön auf 65% des Anfangsgewichtes eingeengt. Es wurde auf die Kühlplatte des LKB Multiphor aufgelegt und mit zwei zusätzlichen Elektrodenstreifen - für die Anode mit 1 M H_3PO_4 und für die Kathode mit 1 M NaOH getränkt - versehen.

Zum Auftragen des Zellextraktes wurde ein Teil des Gels mit dem Probenaufträger ausgestochen, mit 3 ml Extrakt vermischt und erneut auf die Glasplatte gegossen.

Der Trennungslauf erfolgte bei 4°C und einer konstanten Leistung von 8 Watt für 16 h. Unmittelbar nach Beendigung des Laufes wurde das Gel mit einer Metallschablone in 30 Fraktionen getrennt und das Gel in Zentrifugenröhrchen überführt. Für die Aktivitätstests wurde es in Puffer, zur Bestimmung des pH-Gradienten in 2 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Vor den Enzymtests wurde die Gelsuspension für 10 min bei 4000 U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. In die Tests wurden je 0.5 ml des Überstandes eingesetzt.

Um größere Extraktmengen auftragen zu können, wurden alternativ die Trägerampholyte nicht in 100 ml destilliertem Wasser, sondern in einem um das Extraktvolumen geringeren Volumen gelöst. Mit dem Extrakt wurde auf 100 ml aufgefüllt und nach Zugabe des Gels wie oben verfahren. Das Einengen erfolgte direkt auf der Kühlplatte des LKB Multiphor. Alle Zellextrakte wurden vor dem Eingießen in das Gel 1 h gegen destilliertes Wasser und 2 h gegen 10 mM EDTA und 1 mM DTE (oder ME) in 5 mM Tris-HCl, pH 7.6, dialysiert.

Zur Anfertigung von Proteinfärbungen des Gels wurde ein trockenes Filterpapier auf das Gel aufgelegt. Nach 2 min wurde der Abklatsch fixiert, gefärbt und wieder entfärbt. Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Fixierlösung: 57.5 g TCA und 17.25 g Sulfosalicylsäure in 500 ml destilliertes Wasser.

Entfärbelösung: 500 ml Äthanol und 160 ml Eisessig mit destilliertem Wasser auf 2 l verdünnt.

Färbelösung: 0.46 g Coomassie-Brilliantblau R 250 in 400 ml Entfärbelösung.

10. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde die Methode der Gelfiltration mit Sephacryl S-300 und Sephacryl S-200 benutzt. Als Eichproteine wurden Blue Dextran (MG = 2000000), Ferritin (MG = 450000), Katalase aus Rinderleber (MG = 240000), Aldolase aus Kaninchenmuskel (MG = 158000), Chymotrypsinogen A aus Rinderpankreas (MG = 250000) und Cytochrom c aus Pferdeherz (MG = 12500) verwendet. Die Eichläufe erfolgten mit 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, in entsprechend voräquilibrierten Säulen. Zur Trennung der Zellextrakte enthielt der Puffer zusätzlich 10 mM EDTA und 1 mM DTE (oder ME). Es wurden 2.5 ml Fraktionen gesammelt. Das Elutionsvolumen der Sulfotransferasen wurde durch Aktivitätstests bestimmt. Die verwendeten Säulen hatten einen Innendurchmesser von 2 cm und eine Länge von 80-84 cm, entsprechend einem Gesamtvolumen von etwa 250-260 ml.

11. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Buchler (Braunschweig): ^{35}S-Sulfat

Baker Chemicals (Holland): Lumagel Szintillator

Bio-Rad. Laboratories (Richmond,Kalifornien): Biorex 5

Boehringer & Söhne (Mannheim): Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung (Combithek) und alle Biochemikalien

Deutsche Pharmacia (München): Dextranblau, Sephadex Gele, Sephacryl S-200 und S-300, Sephadex A-25

LKB (Gräfelfing): Alle Materialien zur isoelektrischen Fokussierung

Merck (Darmstadt): HPTLC-Platten zur Dünnschichtchromatographie und alle anderen p.a. Chemikalien

Serva (Heidelberg): Methylviologen

Sigma (München): ATP-Sulfurylase aus Bäckerhefe, O-Acetylserin

ERGEBNISSE

I. Synthese und Reinigung der Schwefelnukleotide APS und PAPS

Die Substrate der in dieser Arbeit untersuchten Sulfotransferasen, APS und PAPS, sind nicht bzw. nicht in der erforderlichen Reinheit im Handel zu erhalten. Die Firma Sigma bietet APS in einer Reinheit von 80-90% und einem Preis von mehr als 3000,- DM je mmol an. PAPS ist im Handel nicht erhältlich. Zudem werden diese Nukleotide für Enzymtests auch mit radioaktiv markiertem Schwefelanteil benötigt; auch in dieser Form werden sie nicht vom Handel angeboten.

Zur Synthese dieser Nukleotide sind neben chemischen Verfahren (Baddiley et al., 1957; Reichard und Ringertz, 1959; Cherniak und Davidson, 1964) vor allem biochemische Methoden mit Extrakten von Chlorella (Hodson und Schiff, 1969; Tsang et al., 1976), Thiobacillus denitrificans (Adams et al., 1971) und Hefen (Robbins und Lipmann, 1957; Robbins, 1963) beschrieben worden. Die Nachteile der meisten Verfahren sind niedrige Ausbeuten und umständliche und zeitraubende Reinigungsprozeduren.

Tsang et al. (1976) benutzen z.B. zur Synthese von PAPS Extrakte aus Chlorella und stellen APS aus PAPS mit Hilfe einer 3'-Nukleotidase aus Roggen her. Die Isolierung des PAPS erfolgt mit stufenweiser Elution mittels Triäthylammoniumhydrogenkarbonat über DEAE-Sephadex. Ungefähr 0.3 mmol (30 µM) PAPS werden innerhalb von 3 bis 4 Tagen in 8-10 l Puffer eluiert und für die Elution von 2 mmol sind über 100 l Puffer nötig. Dieses zeit- und arbeitsaufwendige Verfahren scheint für die Präparation größerer Nukleotidmengen vollkommen ungeeignet zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Synthese von PAPS ein angereicherter Extrakt aus Bäckerhefe verwandt. PAPS wurde in Anlehnung an die für die APS-Reinigung ausgearbeitete Methode isoliert.

Für die AP^{32}S-Synthese ist die beste Methode wohl der Weg

über die APS-Reduktase aus Thiobacillus denitrificans (Adams et al., 1971). Diese Methode wurde auch von Cooper (Cooper, 1979; Cooper und Trüper, 1979) angewandt. Er arbeitete ein Reinigungsverfahren für APS aus, das folgende Schritte vorsieht :
Der Syntheseansatz (1 l) wird auf Dowex aufgetragen und mit einem 5 l-Gradienten von 0-2 M NaCl in 7 M Harnstoff eluiert. Die Harnstoffzugabe ist unter diesen Bedingungen erforderlich, um Ferrocyanid von APS zu trennen. Zur Entsalzung wird das APS aus dem Eluat der Dowex-Säule auf etwa 6 l verdünnt, auf eine Säule mit Biorex 5 aufgetragen und mit einem 2 l -Gradienten von 0-1.5 M NH_4HCO_3 eluiert. Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber früher beschriebenen liegen in der Möglichkeit, mehrere mmol auf einmal zu reinigen. (Wegen der kurzen Halbwertszeit von etwa 87 Tagen für ^{35}S-Schwefel ist es im Falle von $AP^{35}S$ allerdings günstiger, jeweils nur den geringeren Bedarf für wenige Monate herzustellen.) Nachteilig sind die Anwendung großer Salz- und Harnstoffkonzentrationen und der durch die immer noch relativ hohen Volumina (über 15 l für 5 mmol APS) bedingte Zeitaufwand von etwa einer Woche. Ein weiterer Nachteil ist die Verwendung von NH_4HCO_3 zur Elution, da NH_4^+- Ionen die Bildung von Adenosin-5'-monophosphoramidat zur Folge haben (Cooper, 1979).

Das erste Ziel dieser Arbeit mußte es daher sein, Verfahren zu finden, mit denen in wenigen Tagen die Isolierung der benötigten Mengen an $AP^{32}S$, $AP^{35}S$, $PAP^{32}S$ und $PAP^{35}S$ möglich ist. Es wurde angestrebt, von möglichst konzentrierten Nukleotidlösungen auszugehen, durch geeignete Wahl des Säulenmaterials und Elutionsmittels sowie die Anwendung eines günstigen Gradienten die Volumina klein und die Salzkonzentration möglichst niedrig zu halten. Ammoniumkarbonatpuffer und Triäthylammoniumkarbonatpuffer wurden vermieden, weil sie die Bildung der Phosphoramidate aus den entsprechenden Schwefelnukleotiden verursachen. Da beide Puffersysteme vollständig flüchtig sind und vor allem deshalb auch Verwendung fanden, wurde mit ihrer Aufgabe gleichzeitig auf eine Gefriertrocknu

der reinen APS- und PAPS-Fraktionen verzichtet. Es war daher erforderlich, diese Nukleotide so konzentriert zu eluieren, daß das Eluat der letzten Säule direkt in die Enzymtests eingesetzt werden konnte.

Die im folgenden beschriebenen Verfahren zur Reinigung der oben genannten Nukleotide beruhen auf der Elution über Sephadex G-25, DEAE-Sephadex A-25 und Biorex 5 mit Tris-HCl als Elutionsmittel. Die reinen Nukleotide wurden nach der Elution in Tris-HCl direkt eingefroren und bei -20°C gelagert. Einschließlich Zellaufschluß, Extraktanreicherung und Nukleotidsynthese ist die Isolierung der angegebenen Mengen in jeweils zwei bis drei Tagen abgeschlossen.

1. Die Synthese und Reinigung von $AP^{32}S$

Synthese

Zur Synthese von $AP^{32}S$ diente ein Zellextrakt von Thiobacillus denitrificans RT (Baldensberger und Garcia, 1975). Der Stamm wurde von der Firma Merck angezogen, wie bei Schedel (1978) angegeben. Das Zellmaterial wurde eingefroren und bei Bedarf aufgetaut. Zum Zellaufschluß wurde je 1 g feuchte Zellmasse in 3 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, aufgenommen, mit 10 µg DNase inkubiert und in der French Presse aufgeschlossen. Das Zell-Lysat wurde zentrifugiert (Sorvall RC 2B, SS 34-Rotor, 10 000 U/min, 10 min) und der Überstand über eine Sephadex G-25 Säule entsalzt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden zur Synthese des APS verwendet. Der Extrakt enthält die an der dissimilatorischen Sulfidoxidation beteiligte APS-Reduktase in einer Aktivität von etwa 1 Einheit/mg Protein. Sie katalysiert folgende Reaktion, deren Gleichgewicht fast vollständig auf der Seite des APS liegt :

$$AMP^{2-} + SO_3^{2-} + 2\ Fe(CN)_6^{3-} \longrightarrow APS^{2-} + 2\ Fe(CN)_6^{4-}$$

Die Anfangskonzentrationen im Syntheseansatz betrugen:

50 mM Tris-HCl, pH 7.6
20 mM AMP
5 mM Na_2SO_3 (in 1 mM EDTA gelöst)
5 mM $K_3(Fe(CN)_6)$
ungefähr 5 Einheiten/ml APS-Reduktase

Der Ansatz wurde durch Zugabe des Na_2SO_3 gestartet und bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Anhand der Entfärbung des Ferricyanids bei seiner Reduktion wurde die Synthese verfolgt und entsprechend dem Verbrauch wurden in Portionen zu je 0.5 mmol insgesamt noch weitere 2.5 mmol Na_2SO_3 und 3.5 mmol Ferricyanid zugefügt. Nach vollständiger Reduktion des Ferricyanids wurde der Ansatz im Eisbad gestoppt. Die Ausbeute betrug über 90% des eingesetzten AMP.

Reinigung

Auf einer Sephadex G-25-Säule (Durchmesser 4.8 cm, Länge 80 cm) wurden mit 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, Proteine und Ferrocyanid vom APS getrennt (siehe Abbildung 4). Die Identifizierung der Nukleotide in den Fraktionen erfolgte anhand der Extinktion bei 259 nm und durch chromatographische Trennung auf nano-DC-Platten. Ferro- und Ferricyanid wurden qualitativ durch Zugabe von Eisen(III)-chlorid zu den Fraktionen nachgewiesen. In dem zu Beginn der Arbeit benutzten Verfahren wurden die APS enthaltenden Fraktionen vereinigt, auf eine Biorex 5 - Säule (2 x 30 cm) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0.5-1.5 M NH_4HCO_3 eluiert. Die APS-haltigen Fraktionen wurden gesammelt, bei - 60°C eingefroren und im Vakuum getrocknet. Das trockene Pulver enthielt zu 90% APS und zu etwa 10% AMP und P_1 (Adenosin-5'-monophosphormidat). Zur Nachreinigung wurde das Pulver wieder in 50 mM Tris-HCl aufgenommen und mit einem linearen Gradienten von 20-400 mM Tris-HCl, pH 7.6, auf DE 52 von den Zerfallsprodukten getrennt. Wegen des Zerfalls in Gegenwart von Ammonium-Ionen und während der Gefriertrocknung wurde die Benutzung flüchtiger Puffersysteme mit anschließender Gefriertrocknung rasch aufgegeben. Außerdem wurde statt DE 52 nur

noch DEAE-Sephadex A-25 verwendet, das eine wesentlich höhere Ladungskapazität besitzt.

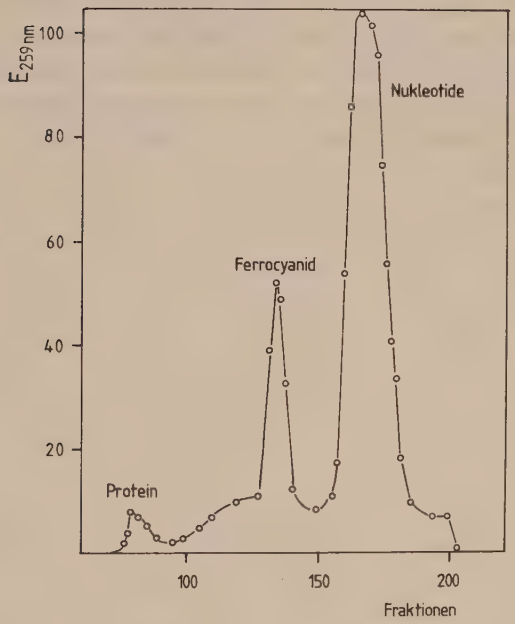

Abb. 4 : Trennung eines APS-Syntheseansatzes auf einer Sephadex G-25-Säule mit 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 7.6; Säulenlänge 84 cm, Säulendurchmesser 4.8 cm, Fraktionsvolumen 10 ml

Bei späteren Synthesen wurde das Eluat der Sephadex G-25 - Säule direkt auf eine DEAE-Sephadex A-25 - Säule (3 x 50 cm)

aufgetragen und mit einem 2 l - Gradienten von 250-550 mM Tris-HCl, pH 7.6, eluiert (siehe Abbildung 5). Die APS-Konzentration in den Fraktionen des Elutionsmaximums beträgt etwa 3 mM. Das APS kann in dieser Form eingefroren mehrere Monate gelagert werden. Wenn höhere Konzentrationen erforderlich sind, können die gesammelten APS-Fraktionen über Bio rex 5 (Säule: 2 x 35 cm) mit einem Gradienten von je 500 ml Tris-HCl, pH 7.6, 0.5-1.5 M weiter konzentriert werden. Wenn sie zusammen mit niedrig-konzentrierten Fraktionen früherer Trennungen aufgetragen werden, treten im Elutionsmaximum Konzentrationen über 10 mM APS auf.

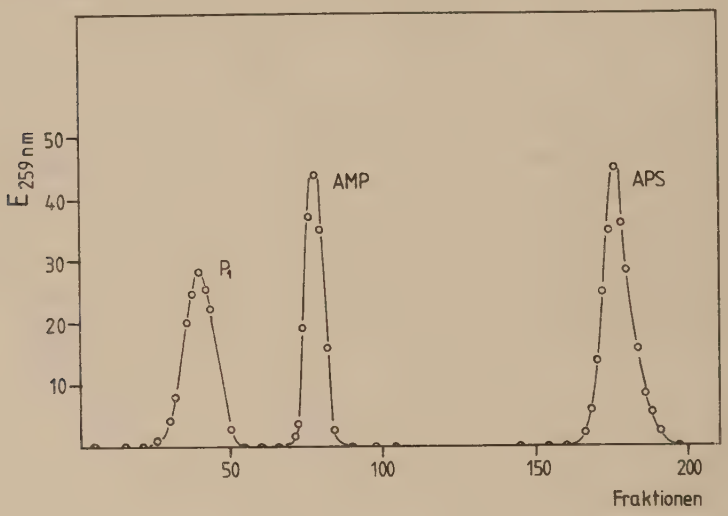

Abb. 5 : Trennung der Nukleotidfraktionen der Sephadex G-25-Säule (Abb. 4) über DEAE-Sephadex A-25 mit einem linearen 2 l Tris-HCl-Gradienten von 250-550 mM, pH 7.6; Säulenlänge 50 cm, Säulendurchmesser 3 cm, Fraktionsvolumen 10 ml.

2. Synthese und Reinigung von $AP^{35}S$

Synthese

Zur Synthese von radioaktiv markiertem $AP^{35}S$ wurden die Reaktionen von ATP-Sulfurylase und anorganischer Pyrophosphatase genutzt. Im Gegensatz zur Reaktion der APS-Reduktase ist die Gleichgewichtslage für die Reaktion der ATP-Sulfurylase extrem ungünstig. Durch die Koppelung mit der PPase und eine starke Erhöhung der ATP-Konzentration kann die Gleichgewichtskonzentration von APS jedoch in einen präparativ akzeptablen Bereich gebracht werden. Die Vorteile dieses Verfahrens für die Synthese von $AP^{35}S$ liegen darin, daß beide Enzyme im Handel günstig angeboten werden und daß das $^{35}SO_4^{2-}$ im Gegensatz zu dem außerdem schwieriger zu handhabenden $^{35}SO_3^{2-}$ beliebig "heiß" geliefert werden kann. Dadurch wird es möglich, kleine Mengen sehr "heißen" APS's herzustellen und mit konzentriertem "kalten" APS auf die gewünschte spezifische Radioaktivität zu "verdünnen".

Ursprünglich wurde der Syntheseansatz in einem Gesamtvolumen von 100 ml und einer spezifischen Aktivität von 10 mCi/mmol Sulfat angesetzt. Aus ökonomischen Gründen und um sehr "heißes" APS für APS-Kinase-Tests zu erhalten, wurde der Ansatz später in einem Volumen von 10 ml bei gleichen Konzentrationen, aber einer spezifischen Aktivität des Sulfates von 100 mCi/mmol durchgeführt. Zum Einsatz in Sulfotransferase-Tests wurde das $AP^{35}S$ auf eine Aktivität von 2000-5000 cpm/nmol eingestellt.

Die Konzentrationen im Syntheseansatz waren wie folgt :

100	mM ATP
50	mM $MgCl_2$
300	mM Tris-HCl, pH 9.0
5	mM Natriumsulfat
0.5	mCi/ml ^{35}Sulfat
2.5	E/ml ATP-Sulfurylase
20.0	E/ml PPase (dialysiert)

Der End-pH betrug 7.5, die Inkubation erfolgte bei 30°C für 8-10 h. Durch regelmäßige Probenentnahme wurde der Reaktions-

verlauf verfolgt. Dazu wurden 2.5 µl Proben auf nano-DC-Platten getrennt, die Zonen mit APS und Sulfat ausgekratzt, mit 500 µl destilliertem Wasser versetzt und im Szintillationszähler ausgezählt. Ein typischer Reaktionsverlauf ist in Abbildung 6 dargestellt. Aus der absoluten Aktivität des $AP^{35}S$ und der spezifischen Aktivität des eingesetzten Sulfates wurde die Menge des gebildeten $AP^{35}S$ errechnet. Die Ausbeute betrug 4-10% des eingesetzten Sulfates.

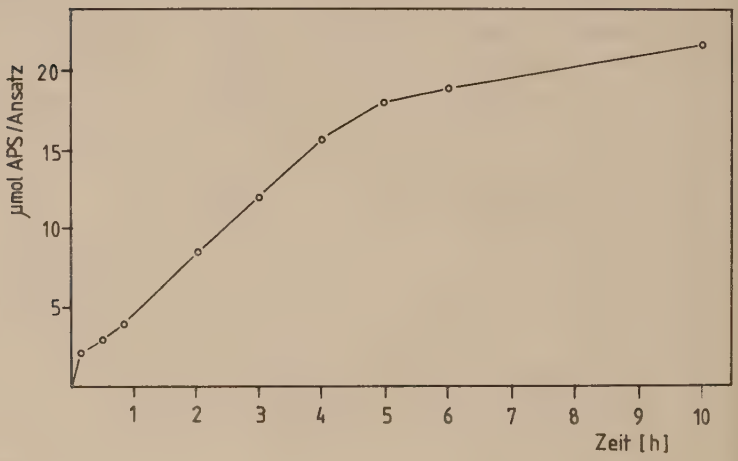

Abb. 6 : Syntheseverlauf einer $AP^{35}S$-Synthese in 100 ml Gesamtvolumen

Reinigung

Der gesamte Syntheseansatz wurde mit destilliertem Wasser 1:2 verdünnt, auf eine DEAE-Sephadex A-25-Säule (2 x 40 cm) aufgetragen und mit einem Gradienten von je 500 ml 250-550 Tris-HCl, pH 7.6, eluiert. Die Abbildung 7 zeigt eine Trennung von AMP, ATP und $AP^{35}S$ unter diesen Bedingungen. Sulfa eluiert wenige Fraktionen hinter AMP. Teilweise wurden die

APS-haltigen Fraktionen mit weniger aktiven Resten aus "alten Beständen" auf eine Biorex 5 - Säule (2 x 35 cm) aufgetragen und mit einem Gradienten von je 500 ml 0.5-1.5 M Tris-HCl, pH 7.6, konzentrierter eluiert.

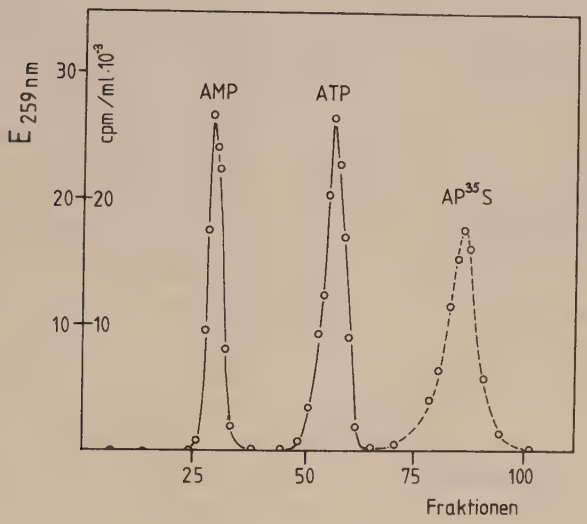

Abb. 7 : Trennung von $AP^{35}S$, AMP und ATP auf DEAE-Sephadex A-25 mit einem linearen 1 l Gradienten von 250-550 mM Tris-HCl, pH 7.6; Säulenlänge 40 cm, Säulendurchmesser 2 cm, Fraktionsvolumen 10 ml. Es wurden je 0.1 mmol AMP und ATP aufgetragen.
——— : UV-Absorption, - - - - : Radioaktivität

3. Synthese und Reinigung von $PAP^{32}S$ und $PAP^{35}S$

Synthesen

Für die Synthese von PAPS wurde eine in den Enzymen ATP-Sulfurylase und APS-Kinase angereicherte Fraktion aus Bäckerhefe verwendet. Die von Robbins (1962, 1963) benutzten Verfahren zur Anreicherung von ATP-Sulfurylase und APS-Kinase

wurden so abgeändert, daß beide Aktivitäten in wenigen einfachen Schritten von der 3'-Nukleotidase getrennt werden konnten. Die Methode wurde im Hinblick auf die Synthese von PAPS optimiert.

Frisches oder eingefrorenes Zellmaterial käuflicher Bäckerhefe wurde in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, mit 0.5 mM EDTA und 1 mM Mercaptoäthanol suspendiert (1 g Feuchtgewicht in 2-3 ml Puffer), mit 10 µg DNase und 10 µg RNase je 10 Zellen inkubiert und in der French-Presse aufgeschlossen. Bei zweimaligem Durchlauf konnten 80-90% der Zellen aufgeschlossen werden. Der Extrakt wurde während des Aufschlusses im Eisbad bei 0-4°C gehalten, anschließend in der Sorvall RC 2B (GSA-Rotor) 15 min bei 12000 U/min zentrifugiert und der Überstand in der Beckman Ultrazentrifuge L5-50 (Ti 60-Rotor) 90 min bei 50000 U/min zentrifugiert. Der von Mitochondrien und anderen Membranfragmenten freie Überstand wurde über eine Sephadex G-25-Säule mit Aufschluß-Puffer entsalzen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mit 1 N Essigsäure tropfenweise auf pH 5.7 eingestellt. Nach Zentrifugation wurde zum Überstand gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung, deren pH mit 37% NH_3 auf 7.7 eingestellt wurde, bis zu 46% Sättigung zugefügt (150 ml/ 100 ml Extrakt). Das mit Ammoniumsulfat gefällte Protein konnte über Nacht im Eis aufbewahrt werden und wurde am nächsten Morgen abzentrifugiert. Das Sediment wurde in möglichst wenig Puffer gelöst und über Sephadex G-25 entsalzen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und direkt zur Synthese eingesetzt. Aus 100 g Zellen wurde etwa 1 g Protein gewonnen.

Die verschiedenen Parameter des Syntheseansatzes wurden durch Variation einzeln optimiert. Mit dem folgenden Ansatz erhält man bei einer Inkubationsdauer von 8-10 Stunden bei 30°C PAPS-Ausbeuten, die zwischen 20-30%, in der Regel um 25% des eingesetzten Sulfates liegen.

Die Konzentrationen in 100 ml Syntheseansatz betrugen:

300 mM Tris-HCl, pH 8.1

10 mM $MgCl_2$

10 mM Na_2SO_4

50 mM ATP
2 E PPase/ml
ungefähr 10 mg Protein/ml

Der End-pH sollte etwa bei 7.5 liegen. Für die Synthese von ^{35}S-markiertem PAPS wird je nach gewünschter Aktivität 1-5 mCi ^{35}S-Sulfat zugegeben. Das entspricht einer Aktivität von 1-5 mCi/mmol Sulfat. Besonders für die "heißen" Ansätze muß die PPase, die in 3.2 M Ammoniumsulfat geliefert wird, sorgfältig dialysiert werden. Dazu werden 1000 E PPase mit 50 mM Tris-HCl, pH 8, auf 5 ml verdünnt und dreimal gegen 3 l des gleichen Puffers dialysiert.

Der Verlauf der PAP^{35}S-Synthese wurde in einem Parallelansatz mit je 1 g Protein nach der Ultrazentrifugation und nach erfolgter Anreicherung zeitlich verfolgt und ist in Abbildung 8 dargestellt.

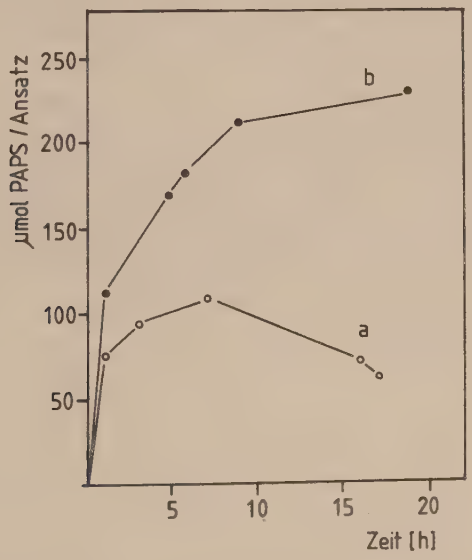

Abb. 8 : PAP^{35}S-Syntheseverlauf mit Rohextrakt nach der Ultrazentrifugation (a) und gereinigtem Proteinpräparat (b).

Reinigung

Aus den gleichen Gründen, die bei der $AP^{32}S$-Reinigung dargestellt sind, wurden anfangs benutzte Trennmethoden mit Biorex 5 und DE 52 mit Elution durch Ammoniumkarbonat oder Triäthylammoniumkarbonat aufgegeben. Es zeigte sich, daß eine DEAE-Sephadex A-25-Säule entsprechender Größe bei geeigneter Gradientenwahl zur Reinigung bereits ausreichte. Dadurch konnte auch das zeitraubende Verdünnen und erneute Auftragen der Eluate von Biorex 5 auf DE 52 oder Sephadex A-25 vermieden werden. Biorex 5 wurde lediglich zur Konzentrierung zu dünner Nukleotidlösungen benutzt.

Eine typische Reinigungsprozedur für PAPS sieht folgendermaßen aus : Der Syntheseansatz wird für 5 min bei 90°C inkubiert und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation beseitigt. Der Überstand wird 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und direkt auf eine DEAE-Sephadex A-25-Säule (3 x 50 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgt mit einem linearen Gradienten von je 1 l 200-800 mM Tris-HCl, pH 7.6. Die Elutionsreihenfolge ist AMP, ADP, ATP, APS, PAPS. Ein typisches Elutionsdiagramm eines Syntheseansatzes ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Fraktionen mit PAPS wurden je nach Konzentration direkt zur Verwendung für die Enzymtests einzeln eingefroren oder gesammelt und über Biorex 5 (Säule 2 x 35 cm) mit einem Gradienten von je 500 ml 0.5-2.0 M Tris HCl, pH 7.6, in höherer Konzentration eluiert (siehe Abbildung 10).

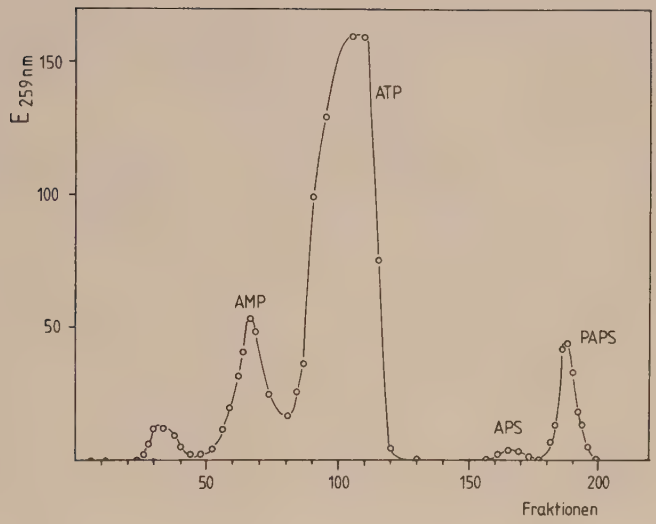

Abb. 9 : Trennung eines PAP^{32}S-Syntheseansatzes über DEAE-Sephadex A-25 mit einem linearen 2 l Gradienten von 200-800 mM Tris-HCl, pH 7.6; Säulenlänge 50 cm, Säulendurchmesser 3 cm, Fraktionsvolumen 10 ml.

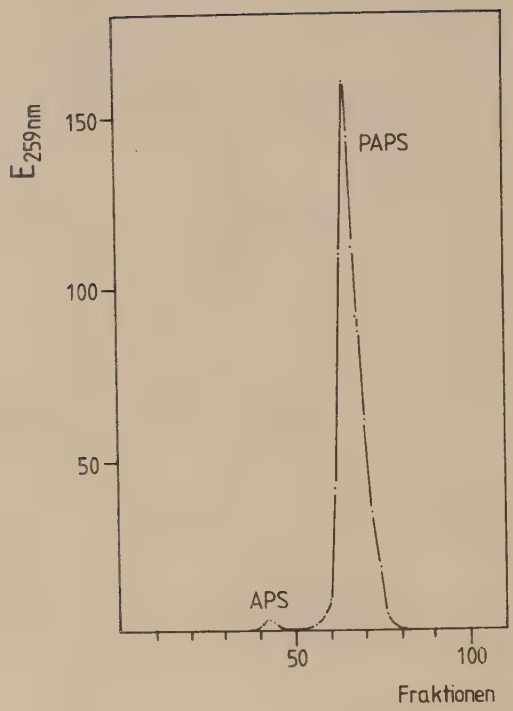

Abb. 10 : Trennung der gesammelten PAP^{32}S-Fraktionen aus drei Synthesen über Biorex 5 mit einem linearen 1 l Gradienten von 0.5-2.0 M Tris-HCl, pH 7.6; Säulenlänge 34 cm, Säulendurchmesser 2 cm, Fraktionsvolumen 10 ml.

4. Diskussion

Die im vorangegangenen beschriebenen Verfahren erlauben innerhalb weniger Tage die Synthese und Reinigung der Nukleotide $AP^{32}S$, $AP^{35}S$, $PAP^{32}S$, $PAP^{35}S$. Wichtige Parameter der Verfahren, wie Substratkonzentration im Syntheseansatz, Gesamtvolumen und benötigte Zeit für die Reinigung und Produktausbeute sind in Tabelle 1 mit den Daten von Robbins (1963), Adams et al. (1971), Tsang et al. (1976) und Cooper und Trüper (1979) vergleichsweise zusammengestellt worden.

Es hatte sich bei Vorversuchen zur PAPS-Synthese herausgestellt, daß die ATP-Konzentration die Synthese begrenzte, da ATP relativ rasch abgebaut wurde. Daher wurde die ATP-Konzentration auf 50 mM erhöht. Die Sulfatkonzentration war bei 10 mM optimal. Mit einem Extrakt aus Bäckerhefe, der durch die im Ergebnisteil aufgeführten Schritte von partikelgebundenener ATPase und 3'-Nukleotidase weitgehend frei war, konnten so im Syntheseansatz Endkonzentrationen von 2-3 mM PAPS erreicht werden. Tsang et al. (1976) geben zwar eine PAPS-Konzentration von 2.4 mM (= 16.4% des eingesetzten Sulfates) an, finden aber nur 9.6% der Radioaktivität aus dem Sulfat im PAPS wieder. Diese Diskrepanz deutet entweder auf eine höhere Sulfatausgangskonzentration als angegeben oder auf ein stark verunreinigtes PAPS-Präparat hin. Neben den besseren Ausbeuten der Synthese in der vorliegenden Arbeit sind aber besonders die Reinigungsprozeduren weit weniger aufwendig. Durch die Wahl eines geeigneten Tris-HCl-Gradienten kann das ganze Elutionsverfahren in 2-3 l und etwa 2 Tagen erfolgen. Wegen der hohen Kapazität der Biorex 5-Säule ist es ohne weiteres möglich, auch größere Mengen von mehr als 1 mmol mit den gleichen Säulen zu reinigen. Die Konzentration des PAPS im Eluat der Biorex 5-Säule ist mit bis zu 10 mM völlig ausreichend, um es in den Enzymtests einzusetzen, in denen normalerweise 100 µM $PAP^{35}S$ und 1 mM $PAP^{32}S$ eingesetzt wurden. Eine Konzentrierung durch Gefriertrocknen ist daher nicht erforderlich. In eingefrorenem Zustand ist PAPS auch in Lösung über mehrere Monate stabil.

Die enzymatische AP^{32}S-Synthese erfolgte in Anlehnung an die Methode, die Adams et al. (1971) benutzten und die von Cooper (1979) in modifizierter Form durchgeführt wurde. Da die von Cooper (1979) ausgearbeitete Methode der APS-Reinigung für diese Arbeit noch nicht zur Verfügung stand, wurde zeitlich parallel ein anderes Reinigungsverfahren ausgearbeitet. Auf Grund der günstigen Gleichgewichtslage der APS-Reduktase - Reaktion konnte die AMP-Konzentration im Syntheseansatz vierfach gesteigert werden; entsprechend wurden auch die Konzentrationen von Ferricyanid und Sulfit erhöht. Um eine quantitative Umsetzung des Ferricyanids zu erreichen, wurde mit einem Überschuß am Sulfit gearbeitet. Durch diese Änderungen konnte gegenüber Cooper (1979) eine etwa vierfach höhere APS-Konzentration im Syntheseansatz erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der AMP-Konzentration ist sicherlich möglich, ohne die prozentuale Ausbeute wesentlich herabzusetzen. Dadurch kann die APS-Konzentration im Syntheseansatz weiter erhöht werden. Wesentlich günstiger als bei Cooper (1979) liegt das Verhältnis des für die Reinigung insgesamt über die Säulen laufenden Volumens zur Menge des gereinigten Nukleotids. Dies liegt in erster Linie an der Wahl der Ionenaustauscher und der Reihenfolge ihrer Verwendung. Das Eluat der G-25-Säule kann direkt auf DEAE-Sephadex aufgetragen werden und das Eluat hieraus wiederum ohne Verdünnung auf Biorex 5, da die Elutionsmolaritäten von APS auf beiden Ionenaustauschern entsprechend weit auseinander liegen. Cooper (1979) hatte auf Dowex 1, um eine Trennung von Ferrocyanid und APS zu erzielen, die Anwendung von 7 M Harnstoff in einem 0-1.2 M NaCl-Gradienten vorgeschlagen. Dieses Problem entfällt bei der hier benutzten Methode, da Ferrocyanid bereits auf Sephadex G-25 quantitativ von APS getrennt wird.

Ebenso wie beim PAPS können auch hier mit den beschriebenen Säulen wesentlich größere Nukleotidmengen isoliert werden, da die Kapazität der Säulen nur teilweise ausgenutzt wurde.

Die hier durchgeführte Reinigung mit Tris-HCl-Gradienten hat den Vorteil, daß mit dem Nukleotid keine Fremdionen in den Testansatz gelangen. Es können aber ohne weiteres auch entsprechende NaCl- oder KCl-Gradienten verwendet werden.

Tabelle 1 : Vergleich verschiedener Syntheseverfahren für APS und PAPS

a) PAPS

Konzentration im Ansatz (mM)			gesamtes Elutions-volumen	Zeit für Reinigung (Tage)	Ausbeute		Autoren
ATP	Sulfat	PAPS			(umol)	(%Sulfat)	
10.0	5.0	0.15	---	---	---	3	Robbins (1963)
29.3	14.6	2.4	14-17 l	3-4	300	10	Tsang et al. (1976)
50.0	10.0	2-3	2-3 l	1-2	200-300	20-30	diese Arbeit

b) APS

Konzentration im Ansatz (mM)				gesamte Elutions-volumen	Zeit für Reinigung (Tage)	Ausbeute		Autoren
AMP	Ferri-cyanid	Sulfit	APS			(mmol)	(% AMP)	
5	10	5	3.0-4.5	3 l	---	0.045	60-90	Adams et al.(1971)
5	15	10	4.9	15 l	5	4.9	98	Cooper (1979)
20	40	30	18.0	2-3 l	2	1.8	90	diese Arbeit

II. Nukleotidspezifität der Sulfatreduktion

In einer Anzahl von Bakterien hat Peck (1961) die methylviologenabhängige Reduktion von APS und PAPS gemessen. Alle Bakterien, die dissimilatorisch Sulfat reduzieren oder Sulfid oxidieren, setzen APS um, während in den Organismen, die Sulfat assimilieren, PAPS reduziert wird. Unter den getesteten Organismen waren Stämme von E. coli, Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas hydrophila, Rhodopseudomonas palustris und Hefen. In Rps. palustris konnte keine Aktivität gefunden werden, in den anderen Stämmen betrug die assimilatorische PAPS-Reduktion 5-148 x 10^{-6} Einheiten/mg Protein. Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß die assimilatorische Sulfatreduktion über PAPS verläuft, die dissimilatorischen Prozesse aber APS benutzen.

Pflanzen und Algen sind assimilatorische Sulfatreduzierer. Von Schmidt (1975) und Tsang und Schiff (1975) konnte gezeigt werden, daß in höheren Pflanzen und einer Reihe von Algen ausschließlich APS-Sulfotransferase-Aktivität vorhanden ist. In E. coli (Tsang und Schiff, 1976) und Hefe (Wilson et al., 1961) wird dagegen nur PAPS reduziert.

In Nitrobacter agilis konnte eine PAPS-Reduktase zusammen mit der APS-Kinase angereichert werden (Varma und Nicholas, 1971b). Aus Einbauversuchen von ^{35}S-Sulfat in Zellbestandteile von Nitrosomonas europaea und den auftretenden Zwischenprodukten schließen Varma und Nicholas (1970), daß auch hier die Reaktion über PAPS verläuft.

Mutanten von Salmonella typhimurium, die keine APS-Kinase besitzen, können PAPS reduzieren, aber kein APS; solche die keine ATP-Sulfurylase haben, können sowohl APS als auch PAPS reduzieren (Dreyfuss und Monty, 1963). Daraus ist zu schließen, daß PAPS das Substrat für die Reduktion ist.

Eine verallgemeinernde mögliche Folgerung aus all diesen Befunden könnte sein, daß die assimilatorische Sulfatreduktion in allen phototrophen Organismen über APS und in allen nicht phototrophen über PAPS verläuft (Tsang und Schiff, 1975).

Eine andere mögliche Folgerung wäre, daß in Pflanzen und eukaryotischen Algen APS das Substrat für die Reduktion ist in Hefen, Pilzen und Bakterien aber PAPS.

Trifft die erste Hypothese zu, dann müssen phototrophe Bakterien APS reduzieren; trifft aber die zweite zu, dann reduzieren sie PAPS.

Eine dritte Möglichkeit ergab sich dann im Laufe dieser Arbeit. Durch Messen der Reduktionsraten von APS und PAPS m einigen phototrophen Bakterien konnten von Schmidt und Trüp (1977) Hinweise dafür erhalten werden, daß einige Arten APS und andere PAPS reduzieren. Schmidt (1977a) konnte aus Rhodospirillum rubrum 1761-1a eine APS-Sulfotransferase anreichern. Er zeigte ebenfalls, daß innerhalb der Cyanobakterien unterschiedliche Systeme existieren (Schmidt, 1977b).

Es soll im folgenden an Stämmen aller Arten der Rhodospirillaceae, die Sulfat assimilieren können, gezeigt werde welches der beiden Schwefelnukleotide sie reduzieren. Zum V gleich sollen einige chemotrophe Bakterien mitgetestet werd

1. Nukleotidspezifität der Sulfotransferasen in Rhodospirillaceae

Um Aussagen über den Reduktionsweg über APS oder PAPS an einer Vielzahl von Stämmen im Rohextrakt machen zu können, wurde ein Testschema auf Grund einer Isotopenverdünnung entworfen. Der einfache Vergleich der Reduktionsraten von $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$ im Rohextrakt reicht zu einer eindeutigen Aussage nicht aus, da beide Nukleotide im Zellextrakt nicht stabil sind. Auf Grund der Gleichgewichtslage zwischen Sulfat, APS und PAPS ist ein Umwandlung von PAPS in APS (durch 3'-Nukleotidasen und möglicherweise APS-Kinase) und von APS in Sulfat (durch ATP-Sulfurylase) stets ohne Energiezufuhr möglich. Die umgekehrten Reaktionen sind jedoch energieabhängig und können daher selektiv ausgeschaltet werden.

Wegen der ungünstigen Gleichgewichtslage der ATP-Sulfurylase-Reaktion ($K = 2.5 \times 10^{-9}$ in Penicillium chrysogenum, Farley et al., 1976) und der Hemmung der Vorwärtsreaktion durch APS, das als Substrat für die Rückwärtsreaktion in Penicillium chrysogenum einen $K_m = 7.1 \times 10^{-6}$ hat (Tweedie und Segel, 1971), ist zu erwarten, daß APS in der eingesetzten Konzentration rasch in Sulfat und AMP gespalten wird. Um die Gleichgewichtslage günstig zu beeinflussen, wurden die Tests standardmäßig mit 100 mM Na_2SO_4 durchgeführt. Außerdem wurde der Einfluß von ATP (10 mM) und $AP^{32}S$ und $PAP^{32}S$ (je 1 mM) getestet. Als radioaktive Schwefelverbindungen wurden in die Tests entweder 20 mM ^{35}S-Sulfat oder 100 µM $AP^{35}S$ oder $PAP^{35}S$ eingesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Stämme auf einem heterotrophen Medium mit Sulfat (5 mM) als einziger Schwefelquelle angezogen. Die Zellextrakte wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.6 mit 1 mM DTE hergestellt und nach der Ultrazentrifugation stets am Tage des Zellaufschlusses direkt getestet. Nach der Inkubation wurden die Tests im Eisbad gestoppt und in Convay-Schalen zur Destillation mit HCl angesäuert. Das säurelabile Sulfit wurde destilliert und in 1 M Triäthanolamin absorbiert. Die destillierte Radioaktivität

wurde im Szintillationszähler ausgezählt.

Es wurde in allen Stämmen die Reduktion von ^{35}S-Sulfat m
und ohne Zusatz von ATP getestet. Diese Reduktion schließt
die Reaktionen der ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase
bzw. der ATP-Sulfurylase, APS-Kinase und PAPS-Sulfotransfer
se ein. Die Reduktion von AP^{35}S wurde ohne Zusatz und mit
satz von ATP, PAP^{32}S und ATP + PAP^{32}S getestet. PAP^{35}S-Redu
tion wurde ohne Zusatz und mit Zusatz von AP^{32}S und ATP + A
getestet. Alle Tests mit radioaktiven Nukleotiden als Subst
wurden mit und ohne Zusatz von 100 mM ^{32}S-Sulfat durchgefüh

Die Aktivitäten liegen in der Regel bei Zugabe von ^{32}S-S
fat mit dem Nukleotid höher, das von dem betreffenden Stamm
reduziert wird, mit dem anderen liegen sie niedriger als in
Tests ohne ^{32}S-Sulfat. Bei den PAPS reduzierenden Stämmen b
trägt die Aktivität mit AP^{35}S und Sulfat zwischen 23-75% de
Aktivität mit AP^{35}S, jedoch 110-380% mit PAP^{35}S und Sulfat
Vergleich zur Aktivität nur mit PAP^{35}S. Der Übersichtlichke
halber sind nur die Werte der Tests, in denen ^{32}S-Sulfat zu
setzt wurde, in der Tabelle 2 aufgenommen worden.

Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, liegen die Umsatzra
mit ^{35}S-Sulfat als Substrat ohne Zusatz von ATP erwartungsg
mäß niedrig. Sie können als Blindwerte aufgefaßt werden und
sind auf den endogenen ATP-Spiegel im nicht dialysierten
Zellextrakt zurückzuführen. Mit Zusatz von ATP steigt die R
der Sulfitbildung entsprechend deutlich an.

Deutlich sind die Unterschiede der Aktivitäten unter ver
schiedenen Bedingungen im Testansatz. Es bilden sich zwei
Gruppen heraus, in die mit wenigen Ausnahmen alle Stämme ei
deutig eingeordnet werden können. In der ersten Gruppe, die
die Stämme von Rps. capsulata Kb 1 bis R. fulvum BN 211 umf
wird AP^{35}S nur in sehr geringer Rate umgesetzt, dieser Umsa
aber durch Zugabe von ATP stark erhöht. Bei den Stämmen die
Gruppe, die eine deutliche Reduktion von AP^{35}S zeigen, Rps.
viridis und R.fulvum, wird sie durch Zugabe von PAP^{32}S etwa
um den Faktor 10 erniedrigt. Die Umsatzraten von PAP^{35}S sin
in dieser Gruppe deutlich höher als die mit AP^{35}S, und AP^{32}

Zugabe hat auf die PAP^{35}S Reduktion nur einen geringen Einfluß. Es ist daher deutlich, daß diese Gruppe PAPS als Substrat für die Reduktion verwendet.

In der zweiten Gruppe von Stämmen wird AP^{35}S sehr gut umgesetzt, ATP bewirkt keine Erhöhung der Reduktionsrate, und PAP^{32}S-Zugabe führt zu einer Erniedrigung, die nie deutlich unter dem Faktor 2 liegt. PAP^{35}S wird von dieser Gruppe zwar auch reduziert, zum Teil sind die Raten sogar höher als mit AP^{35}S, aber die Zugabe von AP^{32}S zum Test erniedrigt diese Rate in der Regel um mehr als den Faktor 10.

Um die in der Tabelle 2 dargestellten Daten besser vergleichen zu können, wurden die Verhältnisse der Aktivitäten unter verschiedenen Bedingungen in den einzelnen Stämmen gebildet und in der Tabelle 3 zusammengestellt. Es wurden 5 verschiedene Verhältnisse ausgewählt, deren Bedeutung für die Alternative APS- oder PAPS-Reduktion und deren zahlenmäßig festgelegte Grenzen im folgenden kurz erläutert werden sollen:

1. ^{35}S-Sulfat/AP^{35}S : Angenommen, der in Betracht gezogene Stamm kann nur PAPS reduzieren. Dann sollte, da sowohl APS als auch Sulfat aktiviert werden müssen, mit beiden Substraten die Reduktionsrate vergleichsweise niedrig sein. Kann der Stamm jedoch APS reduzieren, dann ist keine Aktivierung des APS erforderlich und die Raten sollten deutlich erhöht sein gegenüber den Werten mit Sulfat als Substrat für die Reduktion. Tatsächlich ist das Verhältnis in der ersten Gruppe zwischen etwa 0.5 - 5 und liegt meist über 1, in der zweiten Gruppe liegt es mit drei Ausnahmen unter 0.1, zum Teil sogar unter 0.01. Die drei Ausnahmen der zweiten Gruppe, bei denen die Werte zwischen 0.17 - 2.5 liegen, sind zwei Stämme von Rps. gelatinosa und Rc. purpureus.

2. AP^{35}S + ATP/AP^{35}S : Auf Grund der notwendigen Aktivierung sollte die Zugabe von ATP bei AP^{35}S im Ansatz zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung führen, wenn PAPS das Substrat für die Sulfotransferase ist, aber keine Steigerung bei den

Stämmen zeigen, die APS reduzieren. Tatsächlich liegen die Werte für das Verhältnis in der ersten Gruppe in der Regel über 5, meist sogar über 10 und schwanken in der zweiten Gruppe um 1, sind stets kleiner als 1.5.

3. $AP^{35}S/PAP^{35}S$: In den Fällen, in denen APS erst aktiviert werden muß, ist mit $AP^{35}S$ ohne Zusatz nur sehr geringe Aktivität zu erwarten. In diesen Stämmen ist das Verhältnis unter 0.1, meist sogar unter 0.05 (Ausnahme: R. fulvum). Liegt das APS reduzierende System vor, dann werden Werte von etwa 1 erhalten. Da in der Regel Aktivitäten an 3'-Nukleotidase in den Extrakten vorhanden sind, kann $PAP^{35}S$ stetig in $AP^{35}S$ umgewandelt werden. Es kann so unter Umständen über den gesamten Testzeitraum ein geringer $AP^{35}S$-Pool erhalten bleiben. Bei Zugabe von $AP^{35}S$ können auf der anderen Seite die hohen Anfangskonzentrationen durch die Katalyse der ATP-Sulfurylase rasch abnehmen, so daß die zum Teil höhere Aktivität mit $PAP^{35}S$ in diesen Stämmen erklärt werden kann.

4. $PAP^{35}S + AP^{32}S/PAP^{35}S$: In Stämmen, die PAPS reduzieren, sollte die Zugabe von $AP^{32}S$ keinen Einfluß auf die Reduktionsrate haben, da es den $PAP^{35}S$-Pool nicht verdünnen kann. Die Verhältniswerte werden entsprechend auch um 1 gefunden. In Stämmen, die APS reduzieren, muß das Verhältnis auf jeden Fall unter 0.1 sein, wenn vorausgesetzt wird, daß der APS-Pool stabil ist und daß $PAP^{35}S$ nahezu quantitativ in $AP^{35}S$ überführt werden kann. Mit Ausnahme von Rc. purpureus und von zwei Stämmen von Rps. gelatinosa liegen die Werte hier auch zwischen 0.01 - 0.1. Werte bei diesen drei Stämmen von etwa 0.4 - 0.5 können unter Umständen damit erklärt werden, daß APS in ihnen wesentlich rascher abgebaut wird und dadurch das aus $PAP^{35}S$ gebildete $AP^{35}S$ nur sehr viel schwächer verdünnt wird als vorausgesetzt wurde (siehe auch unter 1 und

5. $AP^{35}S + PAP^{32}S/AP^{35}S$: Bei PAPS reduzierenden Stämmen sind beide Aktivitäten absolut sehr niedrig, so daß das Verhältnis nicht sehr aufschlußreich ist. In den Stämmen, die

APS reduzieren, liegen die Werte zwischen 0.2-0.7, zeigen also auch eine Umwandlung von PAPS in APS an.

Bis auf wenige Einzeldaten lassen sich die Werte eindeutig in das gebildete Schema einfügen. Bei den Stämmen der Gruppe 1 fällt nur Rps. viridis wegen seiner relativ hohen Umsatzrate von APS auf und R. fulvum wegen seines hohen Wertes mit ^{35}S-Sulfat und des ebenfalls hohen Wertes mit $AP^{35}S$ auf. In beiden Stämmen weisen jedoch die Zunahme der Reduktionsrate von $AP^{35}S$ mit ATP, deren starker Abfall bei Zusatz von $PAP^{32}S$ und der geringe Einfluß von $AP^{32}S$ auf den $PAP^{35}S$-Umsatz auf eine Reduktion über PAPS hin.

Ein PAPS reduzierendes System ist somit in den folgenden phototrophen Bakterien nachgewiesen (in Klammern die Zahl der getesteten Stämme) :

Rps. capsulata (1)
Rps. sphaeroides (1)
Rps. sulfidophila (3)
Rps. palustris (2)
R. rubrum (2)
R. fulvum (1)
Rps. viridis (1)

Bei den Stämmen in der Gruppe 2 fallen beide Stämme von Rps. gelatinosa und Rc. purpureus dadurch auf, daß der Umsatz von $PAP^{35}S$ in Gegenwart von $AP^{32}S$ wesentlich weniger stark abfällt als erwartet und auch die Reduktion von $AP^{35}S$ im Verhältnis zu der des Sulfates deutlich niedriger ist als in den anderen Stämmen der Gruppe. Dieses Verhalten kann in beiden Fällen durch eine schnelle Hydrolyse des APS zu Sulfat und AMP erklärt werden (siehe unter 4).

Ein APS reduzierendes Enzymsystem ist in den folgenden phototrophen Bakterien gefunden worden :

Rps. acidophila (1)
Rps. globiformis (1)
Rm. vannielii (1)
Rc. purpureus (1)
R. tenue (1)
Rps. gelatinosa (2)

Außer den in Tabelle 2 aufgeführten Stämmen wurden auch R. photometricum, R. molischianum, Rps. spec. 985 und Rps. sulfidophila 982 auf ihre Fähigkeit zur Sulfatreduktion getestet. In keinem der Stämme wurden Aktivitäten gefunden, die deutlich über den experimentellen Blindwert hinausgingen. Die gefundenen Werte für Stamm 985 weisen auf eine Reduktion über PAPS in diesem Stamm hin. In Rps. globiformis wurden deutlich meßbare Aktivitäten nur gefunden, wenn die Anzucht mit 1 mM O-Acetylserin im Medium erfolgte (siehe auch : Regulation der Sulfatreduktion). Die in Tabelle 2 aufgeführten Daten sind mit Zellextrakten erhalten, die mit O-Acetylserin angezogen wurden.

Tabelle 2 : Reduktionsraten von ^{35}S-Sulfat, $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$ in Rhodospirillaceae

Testbedingungen	^{35}S-Sulfat		$AP^{35}S$				$PAP^{35}S$		
	o	+ ATP	o	+ ATP	+ $PAP^{32}S$	+ $PAP^{32}S$ + ATP	o	+ $AP^{32}S$	+ $AP^{32}S$ + ATP
Rps. capsulata Kb1	50	790	20	340	10	10	930	620	550
Rps. sphaeroides 17023	30	180	9	90	9	7	410	220	210
Rps. sulfidophila W_4	58	200	12	110	6	24	502	521	384
Rps. sulfidophila 1999	17	400	6	81	6	16	351	328	204
Rps. viridis BN 170	25	297	63	196	7	14	1486	997	651
Rps. palustris DSM 126	5	81	5	125	1	n.b.	328	287	n.b.
Rps. palustris $1a_1$	39	627	9	61	7	18	138	194	153
R. rubrum HA	17	80	3	17	10	7	93	88	84
R. rubrum S_1	n.b.	n.b.	19	395	5	5	1925	1763	1762
R. fulvum BN 211	210	420	500	2720	30	150	2490	2000	1410
R. tenue BN 230	34	412	4200	4027	1551	1839	2788	43	107
Rps. gelatinosa 149	95	386	186	248	76	64	219	116	108
Rps. gelatinosa BN 151	138	77	323	237	91	89	404	180	268
Rc. purpureus 6770	12	24	68	67	45	n.b.	73	28	n.b.
Rps. acidophila 7050	5	151	1263	982	277	n.b.	1173	73	n.b.
Rps. globiformis 7950	79	34	1343	1152	775	n.b.	1747	28	n.b.
Rm. vannielii 17100	27	654	902	760	435	573	1523	78	21

Alle Angaben : pmol SO_2 gebildet/mg Protein x h; o = ohne Zusatz, n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 3 : Nukleotidspezifität der Sulfotransferasen in Rhodospirillaceae

Aktivitäts-verhältnisse	$^{35}SO_4^{2-}$ / $AP^{35}S$	$AP^{35}S$ + ATP / $AP^{35}S$	$AP^{35}S$ / $PAP^{35}S$	$AP^{35}S$ + PAPS / $AP^{35}S$	$PAP^{35}S$ + APS / $PAP^{35}S$
Rps. capsulata Kb1	2.5	17.0	0.022	---	0.67
Rps. sphaeroides 17023	3.3	10.0	0.022	---	0.54
Rps. sulfidophila W_4	4.8	9.2	0.024	---	0.93
Rps. sulfidophila 1999	2.8	13.5	0.017	---	1.04
Rps. viridis BN 170	0.4	3.1	0.042	---	0.67
Rps. palustris DSM 126	0.83	20.8	0.018	---	0.88
Rps. palustris $1a_1$	4.3	6.8	0.065	---	1.41
R. rubrum HA	5.7	5.7	0.032	---	0.95
R. rubrum S_1	--	20.8	0.010	---	0.92
R. fulvum BN 211	0.42	5.4	0.201	---	0.80
R. tenue BN 230	0.0081	0.96	1.506	0.369	0.015
Rps. gelatinosa BN 151	2.43	0.73	0.800	0.282	0.446
Rps. gelatinosa 149	0.51	1.33	0.849	0.409	0.530
Rc. purpureus 6770	0.176	0.99	0.932	0.662	0.384
Rps. acidophila 7050	0.0040	0.78	1.077	0.219	0.062
Rps. globiformis 7950	0.059	0.85	0.769	0.577	0.016
Rm. vannielii 17100	0.030	0.84	0.592	0.482	0.051

2. Nukleotidspezifität der Sulfotransferasen in einigen chemoorganotrophen Bakterien und in Hefe

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß phototrophe Bakterien teils über sulfatreduzierende Enzymsysteme verfügen, die APS, teils solche, die PAPS reduzieren. Ähnliche Ergebnisse fand Schmidt (1977b) in verschiedenen Cyanobakterien. An chemotrophen Bakterien wurden bisher fast ausschließlich Vertreter der Enterobacteriaceae untersucht (Peck, 1961; Tsang und Schiff, 1975, 1976; Dreyfuss und Monty, 1963). Da auf Grund der Befunde in phototrophen Bakterien und Cyanobakterien angenommen werden konnte, daß auch in chemotrophen Bakterien nicht ausschließlich PAPS reduzierende Systeme vorhanden sind, sollten auch einige nicht phototrophe Bakterien in die Untersuchungen einbezogen werden. Als gut untersuchte Organismen wurden auch Extrakte von Hefe und E. coli getestet. Bisher gibt es keinen Hinweis auf ein APS reduzierendes Enzym-System in chemotrophen Bakterien.

Die Herstellung der Zellextrakte und die Durchführung der Tests erfolgte so wie in Material und Methoden und im vorangegangenen Abschnitt dargelegt wurde. Die Daten sind wie bei den phototrophen Bakterien zusammengestellt. Tabelle 4 zeigt die absoluten Aktivitäten in pmol/mg Protein x h und in Tabelle 5 sind die Verhältnisse verschiedener Aktivitäten zueinander dargestellt. Entsprechend den im vorigen Abschnitt angestellten Überlegungen ergibt sich aus diesen Daten eindeutig, daß Serratia marcescens, Escherichia coli, Saccharomyces carlsbergensis und Paracoccus denitrificans PAPS reduzieren und daß Pseudomonas aeruginosa und Alkaligenes eutrophus APS reduzieren. Die Ergebnisse mit Bacillus subtilis lassen keinen klaren Schluß zu, jedoch scheint eine Reduktion über PAPS wahrscheinlicher zu sein als der Weg über APS.

In den ebenfalls getesteten Sarcina lutea und Staphylococcus aureus konnte keine Aktivität gefunden werden.

Tabelle 4 : Reduktionsraten von ^{35}S-Sulfat, $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$ in einigen chemoorganotrophen Bakterien und Hefe

Testbedingungen	^{35}S-Sulfat		$AP^{35}S$				$PAP^{35}S$		
	o	+ ATP	o	+ ATP	+ $PAP^{32}S$	+ $PAP^{32}S$ + ATP	o	+ $AP^{32}S$	+ $AP^{32}S$ + ATP
Serratia marcescens	51	962	189	3400	194	167	4762	4703	3567
Escherichia coli	16	1533	11	680	27	354	13407	12883	12090
Saccharomyces carlsb.	115	1371	25	93	26	42	955	1021	990
Paracoccus denitrificans	30	203	11	50	6	n.b.	186	182	n.b.
Pseudomonas aeruginosa	28	631	17228	20922	9941	18925	12466	928	288
Bacillus subtilis	120	294	510	385	55	122	1250	321	263
Alkaligenes eutrophus	85	3359	7513	8926	2181	n.b.	5054	354	n.b.

Alle Angaben in pmol SO_2 gebildet/mg Protein x h; o = ohne Zusatz, n.b. = nicht bestimmt

Tabelle 5 : Nukleotidspezifität der Sulfotransferasen in einigen chemoorganotrophen Bakterien und in Hefe

Aktivitäts-verhältnisse	$^{35}SO_4^{2-}$ / $AP^{35}S$	$AP^{35}S$ + ATP / $AP^{35}S$	$AP^{35}S$ / $PAP^{35}S$	$AP^{35}S$ + PAPS / $AP^{35}S$	$PAP^{35}S$ + APS / $PAP^{35}S$
Serratia marcescens	0.270	17.90	0.040	---	0.990
Escherichia coli	1.450	61.80	0.001	---	0.960
Saccharomyces carlsb.	4.600	3.70	0.026	---	1.070
Paracoccus denitrificans	2.730	4.50	0.059	---	0.980
Bacillus subtilis	0.230	0.75	0.408	---	0.260
Pseudomonas aeruginosa	0.002	1.21	1.380	0.58	0.074
Alkaligenes eutrophus	0.011	1.19	1.490	0.29	0.070

3. Diskussion

Mit Ausnahme von Rps. sulfoviridis, das nicht auf Sulfat als einiger Schwefelquelle wachsen kann, wurden Stämme aller Arten der Rhodospirillaceae auf die Fähigkeit, APS oder PAPS zu reduzieren, getestet. Dabei zeigte es sich entgegen allen Voraussagen, daß innerhalb dieser Familie in der Sulfatassimilation nicht einheitlich APS oder PAPS reduziert wird, sondern daß von Art zu Art Unterschiede existieren. Daneben wurden einige ausgewählte chemotrophe Bakterien untersucht, unter denen zum ersten Male auch APS reduzierende Stämme gefunden wurden.

Es wurden in allen vier Gattungen der Rhodospirillaceae Arten gefunden, die das Sulfat über APS reduzieren, und zwar Rm.vannielii, Rc. purpureus, R. tenue, Rps. acidophila, Rps. globiformis und Rps. gelatinosa.

PAPS kann sowohl von Vertretern der Gattung Rhodospirillum als auch von Rhodopseudomonas-Arten reduziert werden.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese Heterogenität die Folge eines häufigen, möglicherweise plasmidgebundenen Genaustausches ist oder tatsächlich die phylogenetische Heterogenität dieser Familie widerspiegelt. Um diese Frage beantworten zu können, wäre es sinnvoll, die Verhältnisse in anderen Bakterienfamilien zum Vergleich heranzuziehen.

Die einzige Familie, in der ausreichendes Datenmaterial zum Vergleich vorhanden ist, sind die Enterobacteriaceae. Peck (1961) wies in Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Proteus mirabilis und Proteus vulgaris eine PAPS-Reduktase nach. Die Befunde in E. coli konnten durch Untersuchungen von Pasternak et al. (1965), Tsang und Schiff (1975, 1976) und der vorliegenden Arbeit bestätigt und ergänzt werden. In Mutanten aus Salmonella typhimurium wurde eine PAPS-Reduktase nachgewiesen und die Regulation des Enzymes durch Cystein untersucht (Dreyfuss und Monty, 1963; Kredich, 1971). In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem klar gezeigt werden, daß die Sulfatreduktion in Serratia marcescens über PAPS verläuft. E

ist somit in Vertretern aus fünf Gattungen der Enterobacteriaceae eine Sulfatreduktion über PAPS nachgewiesen worden, und der Schluß liegt nahe, daß alle Enterobacteriaceae eine PAPS-Reduktase haben. Nun sind die Enterobacteriaceae offensichtlich eine phylogenetisch sehr einheitliche Gruppe von Organismen. Von den phototrophen Bakterien nimmt man aber an, daß sie eine der ältesten Organismengruppen darstellen, die daher in ihren heute lebenden Vertretern große phylogenetisch bedingte Unterschiede aufweist. So sind bisher die Gattungen der phototrophen Bakterien im Sinne einer determinativen Taxonomie nach zur sicheren Bestimmung sinnvollen Eigenschaften abgegrenzte Gruppen, die keine phylogenetischen Beziehungen widerspiegeln.

Es konnte gezeigt werden, daß die räumlichen Strukturen des Cytochrom c_2 aus R. rubrum sehr große Ähnlichkeit mit dem Cytochrom c_{550} aus Paracoccus denitrificans, dem nächsten "Vorfahren" unserer Mitochondrien, hat (Almassy und Dickerson, 1978). Eine nahe Beziehung wurde auch zwischen Paracoccus denitrificans und Rps. sphaeroides auf Grund starker Übereinstimmung der Basensequenzen der 23 S ribosomalen RNS gefordert (MacKay et al., 1979). In einer Untersuchung der 16 S ribosomalen RNS-Homologien verschiedener Rhodospirillaceae konnten folgende Beziehungen gefunden werden (Gibson et al., 1979) :
Wie erwartet stehen Rps. capsulata und Rps. sphaeroides einander am nächsten (S_{AB} = 0.7). Als dritter Organismus dürfte zu dieser ersten Gruppe noch Rps. sulfidophila hinzukommen. Eine zweite Gruppe, die zu allen anderen Rhodospirillaceae die niedrigste Homologie (S_{AB} = 0.27 - 0.36), aber untereinander ebenfalls hohe Übereinstimmung zeigt (S_{AB} = 0.6), wird von R. tenue, Rps. gelatinosa und Rc. purpureus gebildet. Eine dritte relativ gut korrelierte Gruppe bilden die sich durch Sprossung teilenden Arten Rps. viridis, Rps. palustris und Rm. vannielii (S_{AB} = 0.52 - 0.58). Ähnliche Ergebnisse erhält man beim Vergleich der Cytochrom c_2 Sequenzen (Ambler et al., 1979).

Ein Vergleich dieser Gruppen mit einigen chemotrophen Bakterien zeigt größte Übereinstimmung der Gruppe 1 mit Paracocc denitrificans und der Gruppe 2 mit Alkaligenes faecalis und Sphaerotilus natans.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, daß alle Vertreter der Gruppe 1 einschließlich Paracoccus denitrificans PAPS reduzieren, alle Vertreter der Gruppe 2 einschließlich Alkaligenes eutrophus aber APS reduzieren. In der Gruppe 3 wird ebenfalls PAPS reduziert, mit Ausnahme von Rm. vanniel und dem von Gibson et al. (1979) nicht untersuchten Rps. ac dophila, das auch in die Gruppe der sprossenden Arten gehör Auf Grund der Ähnlichkeit im sulfatreduzierenden System und der Struktur des Cytochrom c_2 (Ambler et al., 1979) sollte Rps. acidophila von den bekannten Arten die nächste Beziehu zu Rm. vannielii zeigen.

Über das Ausmaß der Unterschiede zwischen beiden sulfatr duzierenden Systemen auf enzymatischer und genetischer Eben liegen keine Informationen vor. Inwieweit die Spezifität fü APS oder PAPS auch Unterschiede in den anderen an der Sulfa assimilation beteiligten Enzymen mitbestimmt, wäre hier von besonderem Interesse. Die gute Korrelation zwischen Ähnlich keit der Cytochrome, der 16 S RNS-Homologien und der Nukleo tidspezifität der sulfatreduzierenden Enzymsysteme in verschiedenen Bakteriengruppen spricht für einen klaren genetisch festgelegten Unterschied der beiden Systeme und gegen eine bloße Änderung der Substratspezifität eines Enzyms. Di einheitliche Reduktion von Sulfat über PAPS in den Enterobacteriaceae und in der Gruppe 1 und über APS in der Gruppe der oben aufgeführten Bakterien sprieht dafür, daß ein Austausch beider Systeme offensichtlich sehr selten stattgefun den hat, wie z.B. bei Rps. acidophila und Rm. vannielii in der Gruppe 3.

III. Eigenschaften der Sulfotransferasen

1. Lokalisierung in der Zelle

Obwohl Ibanez und Lindstrom (1962) über die Bildung von PAPS durch Chromatophoren in R. rubrum berichten, konnten seitdem nur Hinweise für eine Lokalisierung der sulfataktivierenden Enzyme im löslichen Protein der Zellfraktionen erhalten werden. Cooper (1979) fand bei Rps. sulfidophila W_4 95% der sulfataktivierenden Aktivität im Überstand des ultrazentrifugierten Zellextraktes. Nach einmaligem Waschen war keine Aktivität mehr in den Chromatophoren nachzuweisen.

Es wurde in allen getesteten Stämmen der Rhodospirillaceae die Reduktion des Sulfats bis zum Sulfit nur im partikelfreien Überstand der Ultrazentrifugation (siehe Material und Methoden) gefunden. In einmal mit Aufschlußpuffer gewaschenen Chromatophoren konnte keine Aktivität gefunden werden. Die spezifische Aktivität war zum Teil im löslichen Protein höher als im Rohextrakt. Die Tabelle 6 zeigt die Aktivitätsverteilung für Rps. viridis, Rps. sulfidophila und R. tenue.

Tabelle 6 : Bildung von säureflüchtigem $^{35}SO_2$ aus $^{35}SO_4^{2-}$ in Zellfraktionen verschiedener Rhodospirillaceae unter Standardbedingungen (pmol $^{35}SO_2$ gebildet/ mg Protein x h)

Stamm	Rohextrakt	lösliches Protein	Chromatophoren
Rps. viridis BN 170	260	212	0
Rps. sulfidophila W_4	80	66	0
R. tenue BN 230	150	259	0

2. pH-Optima

Die Bestimmung der pH-Optima erfolgte im löslichen Protein mit 100 mM Tris-HCl-Puffer im Bereich von pH 7.0-9.5. In Abb. 11 sind die Aktivitäten in R. tenue mit $AP^{35}S$ und in Rps. sulfidophila mit $PAP^{35}S$ dargestellt. In beiden Stämmen wird ein breites Optimum gefunden mit der höchsten Aktivität bei pH 7.5 bzw. pH 8.0. Die Tests wurden standardmäßig bei den entsprechenden pH-Werten durchgeführt.

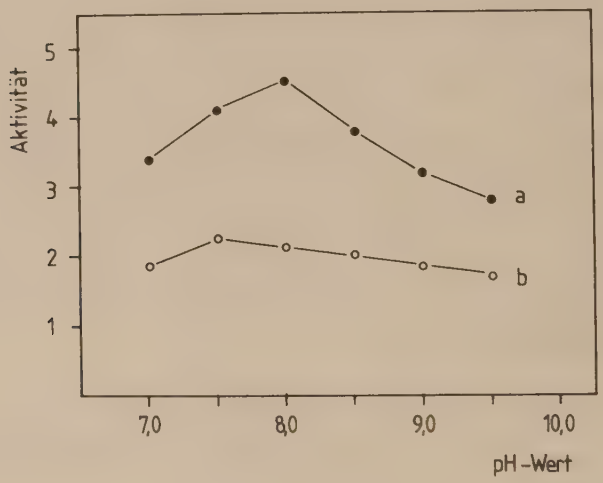

Abb. 11 : pH-Optimum der Sulfotransferase :
a) Rps. sulfidophila W_4 (pmol $PAP^{35}S$/mg Protein x h x 10^{-1})
b) R. tenue BN 230 (pmol $AP^{35}S$/mg Protein x h x 10^{-3}

3. Einfluß von Thiolverbindungen

Sämtliche Sulfotransferasen benötigen für ihre Funktion Thiolverbindungen. Es wurde der Einfluß von Cystein (Cys), Mercaptoäthanol (ME), reduziertem Glutathion (GSH),

2',3'-Dimercaptopropanol (British Anti-Lewisit, BAL) und Dithioerythrit (DTE) getestet. Die Konzentration der Thiolverbindung im Testansatz betrug jeweils 10 mM. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt, die die relative Aktivität, bezogen auf die Aktivität mit DTE angibt.

Tabelle 7 : Sulfotransferase-Aktivität unter Standardtestbedingungen mit 0.05 ml des aus Spinat isolierten Faktors und Zusatz von verschiedenen Thiolverbindungen (relative Aktivität in %)

Stamm	DTE	GSH	BAL	Cys	ME	ohne Zusatz
R. fulvum	100	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Rc. purpureus 6770	100	"	"	"	"	"
Rps. sulfidophila W_4	100	"	"	"	"	"
Rps. capsulata Kb_1	100	"	"	"	"	"
Rps. sphaeroides 17023	100	"	"	"	"	"
Rps. viridis BN 170	100	"	"	"	"	"
R. tenue BN 230	100	3	8	3	3	1
R. rubrum S_1	100	17	20	7	6	7
Rm. vannielii 17100	100	7	15	10	5	1
Rps. acidophila 7050	100	3	8	2	3	1
Rps. gelatinosa 149	100	10	9	12	6	(10)
Rps. palustris $1a_1$	100	8	20	13	12	(10)
Serratia marcescens	100	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Pseudomonas aeruginosa	100	8	25	4	6	1
Escherichia coli	100	23	17	1	4	1
Alkaligenes eutrophus	100	3	8	3	6	1

(10): unter 10%

Ohne Ausnahme und unabhängig davon, ob APS oder PAPS reduziert wird, ist die Aktivität mit DTE am höchsten und beträgt mit den anderen Thiolverbindungen in den meisten Fällen weniger als 10% davon. Am besten kann BAL das DTE ersetzen. Die

Aktivität mit diesem Dithiol ist in Rps. palustris, Rm. vannielii, R. rubrum, E. coli und Pseudomonas aeruginosa zwischen 15-25%. R. rubrum, Rps. gelatinosa und E. coli können auch reduziertes Glutathion anstelle von DTE verwenden (10-23%). Die Notwendigkeit des Dithiols DTE gilt für beide Sulfotransferasen, die APS-Sulfotransferase und die PAPS-Sulfotransferase.

4. Einfluß von 5'-AMP, 3'-AMP und 3'5'-ADP

Der Einfluß von je 10 mM 5'-AMP, 3'-AMP und 3'5'-ADP wurde im löslichen Protein der in Tabelle 8 aufgeführten Stämme getestet. Es wurde entsprechend der Nukleotidspezifität der Sulfotransferase die Reduktion von $AP^{35}S$ bzw. $PAP^{35}S$ zu säureflüchtigem $^{35}SO_2$ gemessen. Die Zugabe von 3'-AMP führte in allen Stämmen zu einer Steigerung der Aktivität. Mit 3'5'-ADP ist die Aktivität nur in den Stämmen deutlich höher, die PAPS reduzieren. Bei Rps. gelatinosa hat 3'5'-ADP keinen Einfluß, bei Rm. vannielii hemmt es. Ebenso aktiviert 5'-AMP bei den Stämmen, die PAPS reduzieren; bei denen, die APS reduzieren, Rps. gelatinosa, R. tenue, Rm. vannielii, hemmt es.

Tabelle 8 : Einfluß von 5'-AMP, 3'-AMP und 3'5'-ADP auf die Sulfotransferaseaktivität unter Standardtestbedingungen (Angaben in pmol $^{35}SO_2$/mg Protein x h)

Stamm	ohne Zusatz	5'-AMP *	3'-AMP *	3'5'-ADP *
R. tenue BN 230	2630	1280	n.b.	n.b.
Rps. gelatinosa BN 151	61	48	90	64
Rps. gelatinosa 149	189	164	208	194
Rm. vannielii 17100	655	338	1192	315
R. fulvum BN 211	127	1072	734	562
Rps. sulfidophila 1999	23	57	47	215
Rps. sphaeroides 17023	40	87	90	99
Rps. capsulata Kb_1	352	462	529	419
Rps. palustris $1a_1$	143	464	245	524
Escherichia coli	5910	10857	9422	7100
Serratia marcescens	162	222	270	167

* Konzentrationen im Test 10 mM

5. Einfluß von Kalium und Natrium

Der Einfluß von KCl und NaCl wurde unter Standardtestbedingungen in Rps. sulfidophila W_4 1999, Rps. sphaeroides 17023, Rps. capsulata Kb_1, Rps. palustris $1a_1$, Rps. gelatinosa DSM 149 und R. fulvum 211 getestet. Die Testkonzentrationen an KCl und NaCl betrugen 1, 5, 10, 100 und 400 mM. Eine deutliche Abhängigkeit von der NaCl- oder KCl-Konzentration wurde bei keinem Stamm beobachtet. Ein Maximum der Aktivität lag für KCl bei Rps. capsulata Kb_1 und Rps. sulfidophila 1999 bei 1 mM, bei allen anderen Stämmen bei 5 mM. Für NaCl waren die Aktivitäten bei 1 mM, bei Rps. capsulata und Rps. palustris bei 5-10 mM am höchsten. In R. fulvum und Rps.

sulfidophila 1999 sind außerdem für beide Salze bei 400 mM, in Rps. gelatinosa bei 400 mM KCl und für Rps. sphaeroides bei 100 mM NaCl höhere Werte gefunden worden, so daß eine aktivierender Einfluß oberhalb des getesteten Konzentrationsbereiches möglich ist.

6. Abhängigkeit von einem niedermolekularem nicht dialysierbarem Kofaktor

Die Abhängigkeit der Sulfotransferase-Aktivität von einem niedermolekularem Proteinkofaktor konnte in E. coli (Tsang und Schiff, 1976), in Chlorella (Schmidt und Schwenn, 1971; Abrams und Schiff, 1973), in Hefe (Wilson et al., 1961) und in Synechococcus (Schmidt und Christen, 1978) nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von Chlorella handelt es sich dabei ausschließlich um PAPS reduzierende Organismen. Schmidt (1977a) hob in einer Gegenüberstellung der Eigenschaften von APS-Sulfotransferase und PAPS-Sulfotransferase neben der Nukleotidspezifität die Notwendigkeit eines zusätzlichen Proteins bei der letzteren im Gegensatz zu der ersteren hervor. Über die Beteiligung verschiedener Kofaktore und deren Molekulargewicht bei den einzelnen Organismen gibt es bisher keine Klarheit.

In Hefen wurde zunächst die Beteiligung eines Kofaktors nachgewiesen, der ein Molekulargewicht von 4000-8000 hat (Wilson et al., 1961). Ein anderes niedermolekulares Peptid, das an die Sulfotransferase fest gebunden wird und offensichtlich die Sulfogruppe vom PAPS übernimmt, wurde von Wilson und Bierer (1976) isoliert. Diese Autoren nehmen für Hefe die Beteiligung von zwei niedermolekularen Faktoren an (siehe Abb. 3). Der eine mit einem Molekulargewicht von etwa 1400 fungiert als Kosubstrat und übernimmt die Sulfogruppe vom PAPS. Der Faktor wird als S-Sulfoverbindung freigesetzt und seine Sulfogruppe von der Sulfitreduktase zur Stufe des Sulfids reduziert und anschließend auf O-Acetylserin über-

tragen. In seiner oxidierten Form wird der Faktor wieder an die Sulfotransferase gebunden, an der er schließlich mit der reduzierten Fraktion C (MG = 4000-8000) reduziert wird und in dieser Form eine neue Sulfogruppe empfangen kann. In Bäckerhefe wurde die Beteiligung des isolierten Thioredoxins (MG = 12600) an der Sulfotransferase-Reaktion von Porque et al. (1970a) nachgewiesen.

Das Molekulargewicht eines hitzestabilen Kofaktors aus Chlorella wurde von Schmidt und Schwenn zu 4000-5000 und von Abrams und Schiff (1973) zu 1500 bestimmt. Eine enzymgebundene Zwischenverbindung mit APS und APS-Sulfotransferase bildet sich nur in Gegenwart des Kofaktors. Eine Beteiligung des Thioredoxins aus E. coli an der Sulfotransferase-Reaktion wurde von Tsang und Schiff (1976) gefunden. Auch in Synechococcus wurde der Kofaktor als Thioredoxin identifiziert (Schmidt und Christen, 1978). Die Molekulargewichte verschiedener Thioredoxine betragen 11700 für E. coli, 11500 für Synechococcus 6301 und 16000-20000 für Chlorella (Wagner et al., 1978).

Ob ähnliche Reaktionsmechanismen wie die für Hefe vorgeschlagenen auch in anderen Organismen ablaufen, und welche Rolle das Thioredoxin übernimmt, ist nicht eindeutig geklärt.

Im folgenden soll die Beteiligung eines Kofaktors bei verschiedenen Rhodospirillaceae und vergleichsweise auch bei einigen chemotrophen Bakterien und Hefe geprüft werden.

Proteinabhängigkeit

In ersten orientierenden Versuchen mit Rps. sulfidophila war festgestellt worden, daß unterhalb bestimmter Proteinkonzentrationen im Testansatz die Aktivitäten unverhältnismäßig stark absanken oder gar nicht mehr meßbar waren. Es wurde daher die Abhängigkeit von der Proteinkonzentration mit löslichem Protein von drei Stämmen gemessen. Um auch sehr geringe Umsatzraten messen zu können, wurde besonders heißes $AP^{35}S$ (11500 cpm/nmol) und $PAP^{35}S$ (17800 cpm/nmol)

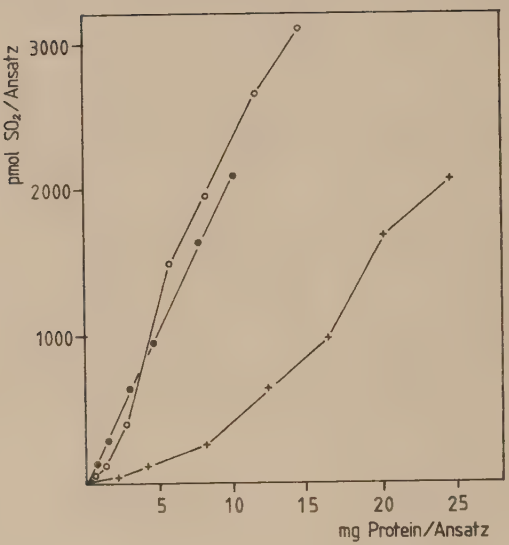

Abb. 12 : Abhängigkeit der Sulfotransferase-Aktivität von der Proteinkonzentration in R. rubrum S_1 (o), Rps. sulfidophila W_4 (+) und Rm. vannielii 17100 (•); die Aktivitätsangaben bei Rm. vannielii (mit O-Acetylserin inkubierte Zellen) sind 1/10 der Aktivität. Tests unter Standardbedingungen.

als Substrat eingesetzt. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 12 für R. rubrum, Rps. sulfidophila und Rm. vannielii dargestellt. Die Extrakte von R. rubrum und Rm. vannielii waren aus Zellen gewonnen, die auf sulfatarmem Medium gewachsen waren und 4 h mit 1 mM O-Acetylserin inkubiert wurden. Eine lineare Beziehung zwischen Aktivität und Proteinkonzentration ist nur in Rm. vannielii zu beobachten. In R. rubrum und Rps. sulfidophila ist ein sigmoider Kurvenverlauf zu beobachten, der auf die Beteiligung eines Kofaktors aus dem Extrakt an der Sulfotransferase-Reaktion hinweist. Um diesen Hinweis zu klären, wurden bei einer größeren Anzahl von Stämmen der Einfluß des gekochten (5 min bei 100°C) und anschließend dialysierten Extraktes auf die Aktivität gemessen.

Faktoreinfluß

Die in Tabelle 9 zusammengefaßten Daten geben die Ergebnisse wieder, die durch Zugabe verschiedener Mengen des gekochten sowie des gekochten und dialysierten eigenen Extraktes (100-300 µl) und des aus Spinat gereinigten Faktors (10-100 µl) erhalten wurden. Eine Aktivierung ist mit dem zelleigenen Faktor bei allen PAPS reduzierenden Arten zu finden, und zwar bei Rps. palustris, Rps. capsulata, Rps. sulfidophila, Rps. sphaeroides, R. fulvum. Der Faktor aus Spinat aktiviert bei Rps. sulfidophila nur schwach und hat bei Rps. palustris keinen Einfluß. In Rps. gelatinosa hemmt der eigene gekochte Extrakt, der Faktor aus Spinat hat keinen (Stamm BN 151) bzw. nur einen sehr geringen aktivierenden Einfluß (Stamm DSM 149). Bei Rps. acidophila und Rc. purpureus, die wie Rps. gelatinosa APS reduzieren, findet durch den gekochten eigenen Extrakt keine Steigerung statt.

Tabelle 9 : Einfluß von zelleigenem und Spinat-Faktor auf die Sulfotransferase-Aktivität

Stamm	zelleigener Faktor	Spinatfaktor
Rps. palustris $1a_1$	+	±
Rps. capsulata Kb_1	+	+
Rps. sulfidophila 1999	(+)	(+)
Rps. sulfidophila W_4	(+)	(+)
Rps. sphaeroides 17023	+	+
R. fulvum BN 211	+	+
Rps. gelatinosa 149	-	(+)
Rps. gelatinosa 151	-	±

+ : Aktivierung; (+) : schwache Aktivierung; ± : kein Einfluß
- : Hemmung

Die Tatsache, daß der Faktor aus Spinat den zelleigenen sehr gut ersetzen kann, spricht für eine geringe Spezifität der Reaktion für einen bestimmten Faktor. Es wurden, um diese Vermutung zu bestätigen, neben dem Faktor aus Spinat auch ähnliche Zellextrakte aus E. coli und Bäckerhefe gewonnen (siehe Material und Methoden). Ihr Einfluß auf die Aktivität wurde bei einer Anzahl von Rhodospirillaceae, einigen chemotrophen Bakterien und Bäckerhefe getestet. Die Wahl der Faktorisolierung fiel auf diese drei Organismen, weil ihre Anzucht relativ einfach war und in allen drei Extrakten eine deutliche Aktivierung durch den gekochten und dialysierten eigenen Extrakt auf die Anwesenheit größerer Faktormengen hinwies. Die Daten sind in Tabelle 10 zusammengefaßt, die neben der absoluten Aktivität ohne Faktorzugabe die relativen Aktivitäten mit den verschiedenen Faktoren enthält. Ein direktes quantitatives Maß für die Faktorkonzentration fehlt.

Trotzdem können folgende Schlüsse im Hinblick auf Faktorbedürfnis und Faktorspezifität gemacht werden :

In allen PAPS reduzierenden Stämmen ist eine Aktivierung durch den eigenen Faktor zu beobachten, von 10% in R. rubrum bis zu 83% in R. fulvum. E. coli und Hefe zeigen mit allen Faktoren eine Aktivitätssteigerung, die mit dem zelleigenen Faktor am größten ist. Eine deutliche Aktivierung durch den Faktor aus E. coli ist außerdem in R. fulvum zu finden, mit dem Faktor aus Hefe in R. rubrum. Der Faktor aus Spinat aktiviert neben Hefe und E. coli auch in Serratia marcescens und R. fulvum.

Von den APS reduzierenden Stämmen wird keiner durch das zelleigene Kofaktorpräparat signifikant aktiviert.

Ps. aeruginosa und R. tenue werden auch von anderen Faktoren nicht deutlich aktiviert, Rm. vannielii und Rps. gelatinosa nur durch den Spinatfaktor (siehe die Tabellen 9 und 10).

Während also in den PAPS reduzierenden Stämmen das Bedürfnis für den Kofaktor sehr deutlich ist und auch eine gewisse Spezifität beobachtet werden kann (der zelleigene Faktor zeigt in der Regel die höchste Aktivierung), ist in den APS reduzierenden Stämmen auf Grund von Proteinabhängigkeit (siehe Abb. 12) und Einfluß zelleigener "Faktorpräparate" kein Faktorbedürfnis vorhanden. Da in Rm. vannielii und Rps. gelatinosa durch den Spinatfaktor eine Aktivitätssteigerung beobachtet wird, ist der Schluß, daß hier kein Faktor benötigt wird, allerdings in Frage gestellt. Das Problem wird bei der Bestimmung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte noch einmal aufgegriffen.

Tabelle 10 : Einfluß verschiedener Kofaktorpräparate auf die Sulfotransferase-Aktivität

Stamm	^{35}S-Nukleotid	Aktivität* ohne Zugabe	Aktivität mit Faktorzugabe** E. coli	Hefe	Spinat	***
R. fulvum BN 211	PAPS	269	x 1.78	x 0.92	x 2.59	x 1.83
Rps. sulfidophila W_4	PAPS	487	x 0.94	x 0.88	x 1.08	x 1.50
R. rubrum S_1	PAPS	520	x 1.01	x 1.20	x 0.84	x 1.10
R. tenue BN 230	APS	4220	x 1.00	x 1.09	x 1.07	x 1.05
Rm. vannielii 17100	APS	2161	x 1.09	x 0.98	x 2.52	x 1.02
E. coli	PAPS	20460	x 1.49	x 1.20	x 1.17	---
Saccharomyces cerevisiae	PAPS	1450	x 1.26	x 1.47	x 1.20	---
Serratia marcescens	PAPS	355	x 1.08	x 0.81	x 2.60	n.b.
Pseudomonas aeruginosa	APS	15108	x 1.03	x 1.04	x 0.98	x 1.02

* pmol $^{35}SO_2$/mg Protein x h; ** je 0.1 ml Kofaktor/Test;
*** Zugabe von je 0.2 ml zelleigenem Kofaktorpräparat

7. Stabilität der Sulfotransferasen

Temperatureinfluß

Um den Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der Sulfotransferase in Rm. vannielii zu testen, wurden mit dem löslichen Protein Standardtests bei 20°, 30°, 40° und 50°C inkubiert und nach 5, 10, 20, 30 und 60 min im Eis abgestoppt. Wie Abbildung 13 zeigt, ist zwischen 20-40°C keine deutliche Steigerung der Aktivität zu beobachten (nach 30 min etwa 20%). Die maximale Aktivität lag nach 30 min bei 30°-40°C; bei 50°C tritt ein rascher Aktivitätsverlust ein.

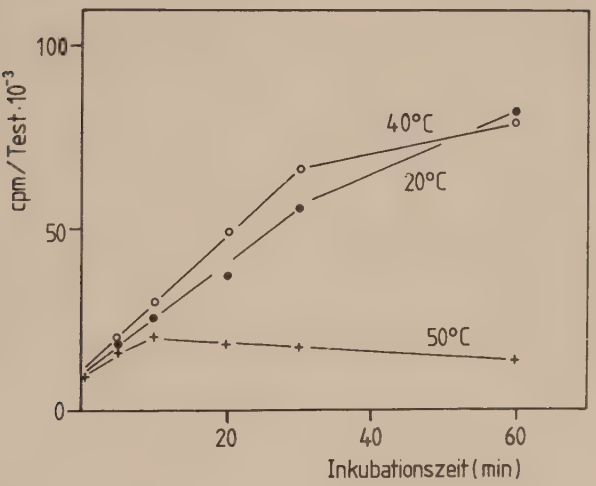

Abb. 13 : Temperatureinfluß auf die APS-Sulfotransferase aus Rm. vannielii 17100 unter Standardtestbedingungen

Einfluß der Lagertemperatur auf die Aktivität

Extrakte von Rm. vannielii wurden jeweils mit und ohne Zusatz von 5 mM DTE und 10% Glycerin bei Zimmertemperatur, im Eis und bei -20°C inkubiert. Proben zur Bestimmung der APS-Sulfotransferase-Aktivität wurden zunächst jeden Tag, dann im Abstand von mehreren Tagen genommen. Abbildung 14 zeigt den Aktivitätsabfall des mit Zusätzen inkubierten Proteins, die sich nur unwesentlich von denen ohne Zusätze unterscheiden. Bei Zimmertemperatur ist schon nach 4 Tagen keine Aktivität mehr vorhanden, und im Eis ist das Enzym nach 8 Tagen fast vollständig inaktiviert. In eingefrorenem Zustand bleibt die APS-Sulfotransferase relativ lange stabil und verliert auch durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren (derselbe Ansatz wurde für jede Proteinentnahme aufgetaut und anschließend wieder eingefroren) die Aktivität erst nach 1-3 Wochen.

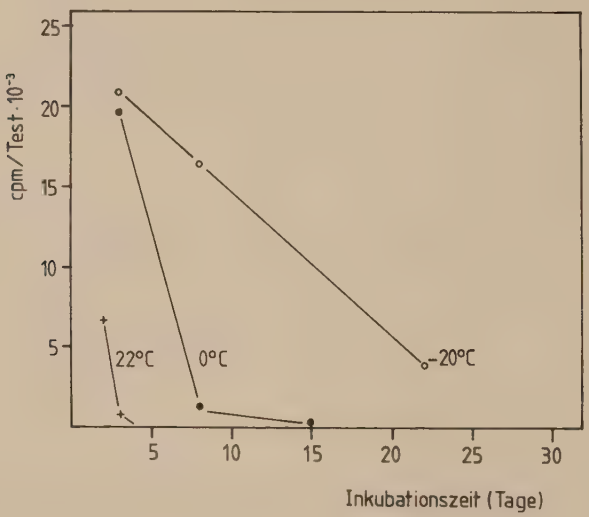

Abb. 14 : Einfluß der Lagertemperatur auf den Aktivitätsverlust der APS-Sulfotransferase aus Rm. vannielii 17100

Einfluß verschiedener Stabilisatoren

Um den Einfluß verschiedener Stabilisatoren auf die Sulfotransferasen aus Rps. sulfidophila, Rps. acidophila, R. tenue und Rm. vannielii zu testen, wurde zum Zellaufschluß Puffer ohne Zusatz von DTE benutzt. Das lösliche Protein wurde mit Zusatz der entsprechenden Stabilisatoren im Kühlschrank bei 6°C für 20 Tage inkubiert. Die Enzymaktivität wurde unmittelbar nach der Ultrazentrifugation im unbehandelten Extrakt und nach 20 Tagen in den inkubierten Extrakten gemessen. Der Extrakt von Rps. sulfidophila W_4 zeigte mit Ausnahme des Ansatzes mit Glycerin keine Aktivität mehr. Die Daten für die anderen Stämme sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

In allen drei Extrakten ist in Ansätzen ohne Zusatz nur zwischen 1-4% der Ausgangsaktivität vorhanden, während in den gleichen Ansätzen, aber bei -20°C eingefroren, sehr gute, bei Rps. acidophila und Rm. vannielii die höchste Aktivität gefunden wurde. Die beste Stabilisierung wurde in Rps. acidophila mit ATP, AMP und Glycerin, in R. tenue mit DTE und EDTA, DTE, Glycerin sowie in Rm. vannielii mit KH_2PO_4, DTE und EDTA, $MgCl_2$ und ME erhalten. Anreicherungsversuche mit diesen Sulfotransferasen wurden in Pufferlösungen durchgeführt, die 10 mM EDTA und 1 mM DTE oder ME enthielten.

Tabelle 11 : Einfluß verschiedener Stabilisatoren auf die Stabilität der Sulfotransferasen aus R. tenue BN 230, Rps. acidophila 7050 und Rm. vannielii 17100 (Angaben in % der Anfangsaktivität)

Stabilisator	Konzentration	R. tenue	Rps. acid.	Rm. van.
Na_2SO_4	100 mM	4.1	3.0	10.2
KH_2PO_4	100 mM	1.8	1.4	75.1
KCl	100 mM	3.0	1.0	11.0
NaCl	100 mM	2.8	1.5	15.8
Glycerin	30%	12.6	13.8	4.9
AMP	10 mM	5.8	48.5	1.4
ADP	10 mM	3.9	8.9	18.2
ATP	10 mM	7.8	51.2	5.2
APS	1 mM	5.3	7.9	2.9
PAPS	1 mM	5.0	5.1	6.9
Cystein	10 mM	1.5	1.5	1.4
ME	10 mM	3.5	0.8	18.7
DTE	10 mM	12.0	0.9	6.6
DTE + EDTA	10 mM	30.1	3.6	37.0
EDTA	10 mM	4.6	8.7	12.4
NH_4Cl	100 mM	4.5	1.3	16.4
$MnCl_2$	10 mM	1.7	1.1	1.2
$MgCl_2$	10 mM	3.3	1.1	31.9
ohne Zusatz	---	3.1	1.1	3.9
o.Z. eingefroren	---	16.4	60.2	86.2

8. Molekulargewichte

Die Molekulargewichte der APS-Sulfotransferasen aus Rm. vannielii 17100, Rps. acidophila 7050, R. tenue BN 230 und Ps. aeruginosa wurden durch Gelfiltration an Sephacryl S-300 und Sephacryl S-200 bestimmt. Die Säulen wurden mit dem für den Zellauschluß verwendeten Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 10 mM EDTA und 1 mM DTE) äquilibriert. Es wurden jeweils 2 ml des löslichen Proteins aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Zur Bestimmung des Elutionsvolumens der APS-Sulfotransferase wurden in die Enzymtests zunächst von jeweils fünf aufeinanderfolgenden Fraktionen je 0.1 ml eingesetzt. Von den aktiven Fraktionsbereichen wurde jede einzelne Fraktion mit je 0.5 ml/Test nachgetestet. Auf Grund der gemessenen Aktivitätsmaxima wurden mit Sephacryl S-300 die in Tabelle 12 aufgeführten Werte erhalten. Die Werte für R. tenue und Rm. vannielii wurden durch eine zusätzliche Bestimmung über eine geeichte Sephacryl S-200-Säule bestätigt. Bei Ps. aeruginosa wurden über Sephacryl S-200 zwei Maxima gefunden, die auf Molekulargewichte von annähernd 140000 und 115000 schließen lassen. Die Differenz entspricht in der Größenordnung dem für Thioredoxine bekannten Molekulargewicht.

Tabelle 12 : Molekulargewichte einiger APS-Sulfotransferasen

Stamm	Molekulargewicht
Rm. vannielii 17100	73 000
Rps. acidophila 7050	105 000
R. tenue BN 230	80 000
Ps. aeruginosa	140 000

9. Isoelektrischer Punkt

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der APS-Sulfotransferasen aus R. tenue BN 230, Rm. vannielii 17100, Rps. acidophila 7050 und Ps. aeruginosa wurden 3-4 ml lösliches Protein zunächst gegen 5 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 10 mM EDTA und 1 mM DTE dialysiert. Das Dialysat wurde in Ultrodex-Gel eingegossen, das in 2% Ampholine, pH 3.5-10.0, suspendiert worden war und, wie in Material und Methoden beschrieben, weiterbehandelt. Zur Bestimmung der Aktivität wurde das Gel in 30 Fraktionen getrennt, jede Fraktion in 2 ml Puffer (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.6) aufgenommen, abzentrifugiert und vom Überstand je 0.5 ml in die Tests eingesetzt. Von dem verwendeten $AP^{35}S$ wurden je Test 50 nmol eingesetzt. Es hatte eine Radioaktivität von über 20 000 cpm/nmol.

Der isoelektrische Punkt der Enzyme aus allen untersuchten Stämmen liegt zwischen 4.8-5.0. Es wurden für die einzelnen Stämme folgende Werte erhalten :

R. tenue	pH 5.0
Rps. acidophila	pH 4.8
Rm. vannielii	pH 4.85
Ps. aeruginosa	pH 4.85

Einheitlich traten jedoch bei allen Experimenten zwei Aktivitätsmaxima auf. Das zweite Maximum lag im Bereich von pH 5.2-5.7. Das Verhältnis der Aktivitäten in den beiden Maxima war aber bei den Stämmen unterschiedlich und zeigte auch bei verschiedenen Läufen mit dem gleichen Zellmaterial Unterschiede.

Die Hauptaktivität bei Rps. acidophila wurde bei pH 5.7 gefunden, während bei pH 4.8 nur etwa 1/5 an Aktivität vorhanden war. Ähnlich lagen die Verhältnisse in einem Experiment mit Rm. vannielii. Bei einem zweiten Experiment mit diesem Stamm, bei dem statt DTE 1 mM ME im Dialysebad war, lag umgekehrt die Hauptaktivität bei pH 4.85 und betrug bei pH 5.2 weniger als 10% davon. Auch bei R. tenue betrug mit DTE im Dialysebad die Aktivität bei pH 5.5 über das doppelte

derjenigen bei pH 5.0, wird jedoch mit ME dialysiert, dann ist die Aktivität bei pH 5.0 etwa 20fach höher als bei pH 5.5.

Auch bei dem nicht-phototrophen Bakterium Pseudomonas aeruginosa traten zwei Maxima auf. Der Extrakt wurde mit 1 mM DTE im Puffer dialysiert und wie die der phototrophen Bakterien behandelt. Hier war auch mit DTE die Aktivität bei pH 4.85 etwa 8fach höher als bei pH 5.4. Für Ps. aeruginosa, R. tenue und Rm. vannielii ist die Aktivitätsverteilung im pH-Gradienten in Abbildung 15 wiedergegeben. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß nicht zwei scharfe Maxima auftreten, wie es bei zwei voneinander unabhängigen Aktivitäten zu erwarten wäre, sondern daß die Aktivität zwischen den Maxima auf einem relativ hohen Level bleibt. Das diffuse Band zwischen beiden Maxima sowie die unterschiedlichen Verhältnisse beider Aktivitäten könnten dadurch erklärt werden, daß sich der isoelektrische Punkt des Proteins durch die Abspaltung eines gebundenen Kofaktors ändert. Es ist denkbar, daß DTE die Abspaltung dieses Kofaktors begünstigt und daß sich dadurch der isoelektrische Punkt ins alkalische verschiebt. Dies spräche für einen stark sauren Kofaktor. Tatsächlich sind alle bisher bekannten Thioredoxine stark saure Proteine.

In den Fraktionen der Aktivitätsmaxima von Ps. aeruginosa wurde der Einfluß des Thioredoxins aus Spinat getestet. Es wurden je 0.1 ml des gereinigten Spinatpräparates pro Test eingesetzt. Während bei Fraktion 7 (pH 4.85) eine geringe Steigerung von 20% beobachtet wurde, betrug sie in Fraktion 10 (pH 5.4) mehr als das 7fache (700%) gegenüber der Aktivität ohne Spinatfaktor. Daraus kann gefolgert werden, daß das bei pH 4.85 akkumulierte Protein der Kofaktor-Enzym-Komplex ist und das bei pH 5.4 akkumulierte Protein das faktorfreie Enzym. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Vorstellung, daß Thioredoxin als Kofaktor der APS-Sulfotransferase an das Enzym gebunden wird.

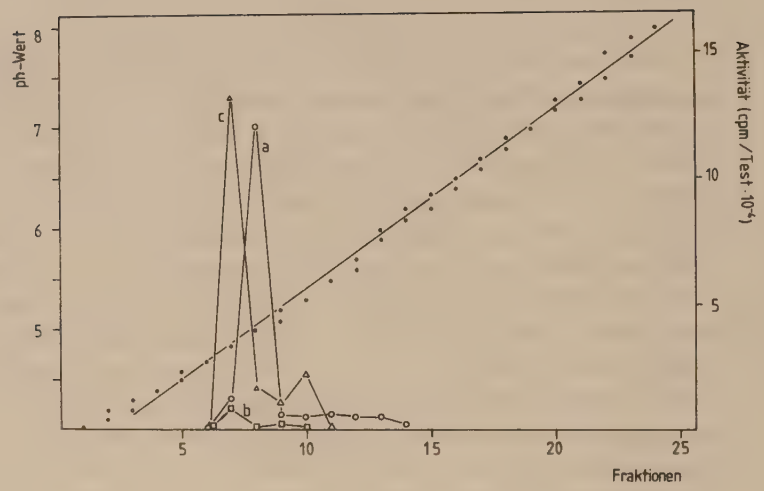

Abb. 15 : Bestimmung des isoelektrischen Punktes der APS-Sulfotransferasen aus R. tenue (a), Rm. vannielii (b) und Ps. aeruginosa (c).
Extrakte wurden dialysiert gegen 5 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 10 mM EDTA und 1 mM ME (bei Ps.aeruginosa 1 mM DTE statt ME). Tests unter Standardbedingungen.

Zur Stützung dieser Hypothese wurde das folgende Experiment mit Rm. vannielii durchgeführt. Ein Ansatz mit 15 ml löslichem Protein wurde wie die Testansätze der APS-Sulfotransferase unter Standardbedingungen mit AP^{35}S und DTE inkubiert, anschließend gegen 5 mM Tris-HCl, pH 7.6, mit 10 mM EDTA und 1 mM ME dialysiert und zur isoelektrischen Fokussierung direkt in das Gel eingegossen. Der pH-Bereich der verwendeten Ampholine lag bei 3.5-10.0. Nach der Trennung wurde die Gelplatte in 30 Fraktionen geteilt und die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen gemessen. Es wurden

außerdem Aktivitätstests mit und ohne Zusatz des Faktors aus Spinat durchgeführt.

Eine radioaktiv markierte Verbindung ist wahrscheinlich in die Anode gelaufen, da die maximale Radioaktivität in den beiden sauersten Fraktionen gefunden wurde. Die Aktivitätsverteilung der Sulfotransferase über die einzelnen Fraktionen ist typisch für ein Kofaktor-freies (mit DTE behandeltes) Enzym, mit dem Maximum bei pH 5.2, sowohl mit als auch ohne Spinatfaktor. Die Aktivitätssteigerung durch den Spinatfaktor betrug das 2.5-5 fache.

Diese Befunde können ein Hinweis darauf sein, daß unter den Testbedingungen die Sulfogruppe an den Faktor (möglicherweise Thioredoxin) gebunden wird und dieser mit der Sulfogruppe vom Enzym losgelöst wird.

Der Aktivitätsverlust durch die isoelektrische Fokussierung war in allen Fällen beträchtlich. In den verschiedenen Experimenten wurden zwischen 1-10 mEinheiten auf die Gelplatte aufgetragen. Nach der Trennung wurden 4% (Rm. vannielii), 6,4% (R. tenue) und 12,6% (R. tenue) wiedergefunden.

3. Diskussion

Alle Untersuchungen an Thiol-Sulfotransferasen wurden bisher an teilweise angereicherten Enzympräparationen durchgeführt, und es sind neben Daten über pH-Optima, Molekulargewichte und die Thiolabhängigkeit nur sehr wenige Eigenschaften bekannt. Im folgenden sollen die in anderen Arbeiten gefundenen Daten mit den eigenen verglichen werden.

Die pH-Optima der Sulfotransferasen von Rps. sulfidophila und R. tenue von 7.5 und 8.0 liegen in dem Bereich, in dem auch die Enzyme aus Chlorella, Hefe und E. coli (Schmidt, 1972; Wilson et al., 1961; Tsang und Schiff, 1976) getestet wurden und die PAPS-Sulfotransferase aus Synechococcus

ihr pH-Optimum hat (Schmidt und Christen, 1978).

Auch die Spezifität für verschiedene Thiolverbindungen ist sehr ähnlich. Alle Sulfotransferasen sind am aktivsten mit DTE, und meistens ist dies auch die einzig wirksame Thiolverbindung. Nur GSH oder das Dithiol BAL können DTE teilweise ersetzen (siehe Tabelle 10). Die Funktion des DTE ist wahrscheinlich die Reduktion des Kofaktors. Im Hefesystem kann es Fraktion "A" (Thioredoxinreduktase) und "C" (Thioredoxin) ersetzen (Wilson und Bierer, 1976).

Neben der Abhängigkeit der Sulfotransferasen von dem Dithiol DTE wird offensichtlich von allen Sulfotransferasen ein niedermolekularer Proteinkofaktor benötigt. Dies gilt sowohl für die gut untersuchten Sulfotransferasen aus Hefe (Wilson et al., 1961; Wilson und Bierer, 1976), Chlorella (Schmidt, 1972) und E. coli (Tsang und Schiff, 1976) als auch für die Enzyme der hier untersuchten Stämme phototropher und nichtphototropher Bakterien. Diese Abhängigkeit ist nicht immer deutlich zu beobachten und zeigt sich teils in einem sigmoiden Verlauf der Aktivität von der Proteinkonzentration (siehe Abb. 12; Wilson et al., 1961; Tsang und Schiff, 1976), teils in einer Aktivitätssteigerung durch Zusatz des gekochten Extraktes oder des Thioredoxinpräparats aus Spinat.

Das Fehlen einer sigmoiden Kurve der Proteinabhängigkeit wie in Rm. vannielii kann damit erklärt werden, daß hier der Kofaktor keine zusätzliche Aktivierung bewirkt, wie das in den anderen Stämmen (Rps. sulfidophila W_4, R. rubrum S_1) möglicherweise der Fall ist, im Überschuß vorhanden oder (und) an das Enzym fester gebunden ist.

Wahrscheinlich ist der Mechanismus der Sulfatreduktion zumindest in den hier untersuchten Organismen mit einer APS-Sulfotransferase (wie z.B. Rm. vannielii 17100) grundsätzlich verschieden von dem Mechanismus, wie er in den Organismen mit PAPS-Sulfotransferasen (z.B. Rps. sulfidophila W_4) abläuft (siehe allgemeine Diskussion).

Die Molekulargewichte der untersuchten APS-Sulfotransferasen zeigen starke Unterschiede zwischen 73000 (Rm.van-

nielii) und 140000 (Pseudomonas aeruginosa), das Enzym aus Spinat hat ein Molekulargewicht von 110000 (Schmidt, 1976). Ähnlich starke Unterschiede sind in den PAPS-Sulfotransferasen von E. coli (300000, Tsang und Schiff, 1976) und Synechococcus (58000, Schmidt und Christen, 1978) gefunden worden.

Über die isoelektrischen Punkte von Thiol-Sulfotransferasen gibt es in der Literatur keine Angaben. Die bei den hier untersuchten APS-Sulfotransferasen beobachteten zwei Maxima sind nicht als zwei unterschiedliche Enzyme zu werten, da die relative Höhe der Aktivitäten beider Maxima im gleichen Zellmaterial von der Präparation des Zellextraktes abhängt.

Die experimentellen Befunde deuten vielmehr darauf hin, daß es sich einmal um das kofaktorfreie Enzym und das andere Mal um den Kofaktor-Enzym-Komplex handelt.

Aus der Verschiebung des isoelektrischen Punktes um 0.35-0.9 pH-Einheiten läßt sich zusätzlich kalkulieren, daß der isoelektrische Punkt des Kofaktors für Rm. vannielii 3.5, für R. tenue 2.8, für Rps. acidophila 2.6 und für Pseudomonas aeruginosa 2.3 beträgt, wenn man Molekulargewichte von 15000, 15000, 30000 und 25000 für die einzelnen Stämme (siehe Molekulargewichtbestimmung) annimmt.

Die Bindung eines niedermolekularen Kofaktors mit einem Molekulargewicht unter 5000 ist daher auszuschließen.

IV Sulfataufnahme in Rps. sulfidophila

1. Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration

Auf sulfatfreiem Medium gewachsene Zellen von Rps. sulfidophila W_4 wurden in 50 ml-Flaschen mit SAT-Medium ohne Schwefelquelle beimpft (300 mg Protein/l), das mit unterschiedlichen Konzentrationen an Na_2SO_4 ergänzt wurde. Jede Kultur erhielt 50 µCi ^{35}S-Sulfat und die Sulfataufnahme wurde über 12 h verfolgt.

In dem getesteten Konzentrationsbereich von 0.01-2.0 mM (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.225, 0.275, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0 mM) Sulfat steigt die Geschwindigkeit der Sulfataufnahme mit steigender Konzentration an, liegt aber bei 0.25 mM ausnahmsweise deutlich niedriger als bei 0.2 mM Sulfat (Abb. 16). Bis zu 0.2 mM wurden innerhalb der ersten 6 h über 85% des eingesetzten Sulfates aufgenommen (bei 0.01 und 0.02 mM schon nach 3 h).

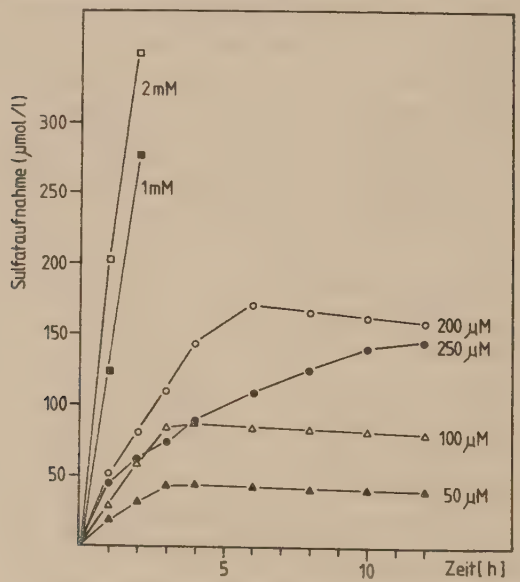

Abb. 16 : Abhängigkeit der Sulfataufnahme von der Sulfatkonzentration in sulfatverarmten Zellen von Rps. sulfidophila W_4

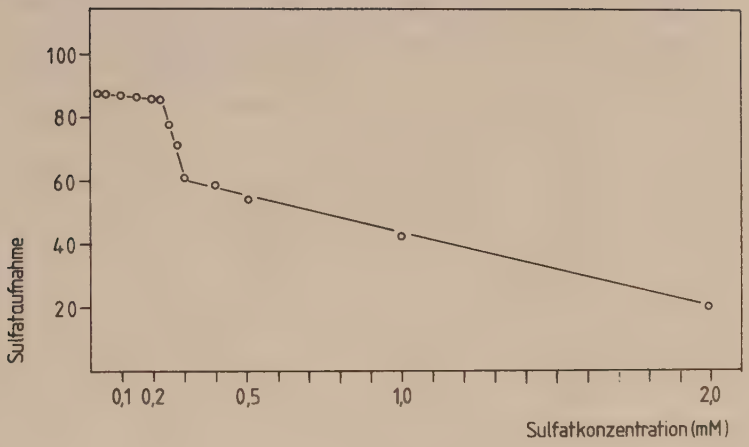

Abb. 17 : Maximale Sulfataufnahme (in % der eingesetzten Sulfatmenge) in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration in Rps. sulfidophila W_4

Das Sulfat war zwar bis 0.2 mM unter den experimentellen Bedingungen innerhalb des Testzeitraumes erschöpft, ist aber auch oberhalb 0.3 mM noch wachstumslimitierend, da weiterhin größere Sulfatmengen aufgenommen werden. Abbildung 17 zeigt die prozentuale Sulfataufnahme in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration. Zwischen 0.2-0.3 mM ist ein steiler Abfall der Geraden zu beobachten, der den Bedarf der Zellen an Sulfat widerspiegelt, aber möglicherweise weise auch auf eine Umstellung in der Sulfataufnahme hindeutet, vor allem, wenn man die Wachstumsraten berücksichtigt. Die Wachstumsrate innerhalb der ersten 12 h hat ein Maximum bei 0.25 mM Sulfat, nimmt dann bis 0.4 mM ab und steigt erst danach wieder steil an.

In Abbildung 18 sind die reziproken Werte der Sulfataufnahmerate (Anfangsgeschwindigkeit nach 1 h) und der

Sulfatkonzentration gegeneinander aufgetragen. Die Punkte lassen sich nicht durch eine einzige Gerade verbinden. Man kann daher annehmen, daß zwei unterschiedliche Enzyme für die Sulfataufnahme in Rps. sulfidophila existieren, das eine mit einem K_m-Wert für Sulfat von 0.32 mM und das andere mit einem apparenten K_m-Wert von 5.6 mM.

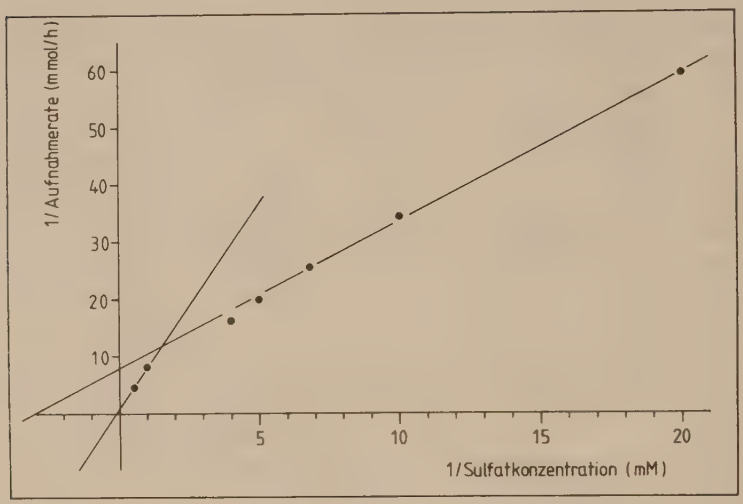

Abb. 18 : K_m-Wert-Bestimmung für die Sulfataufnahme in sulfatverarmten Zellen von Rps. sulfidophila W_4

2. Hemmung der Sulfataufnahme durch reduzierte Schwefelverbindungen

Rps. sulfidophila W_4 wurde 12 h in sulfatfreiem SAT-Medium inkubiert. Zur Startzeit des Experiments wurden 0.25 mM Na_2SO_4 (4 mCi/mmol) zugesetzt und bei 25°C und 5000 Lux inkubiert. Nach 60 min wurden in verschiedene Testansätze je 0.1, 0.2 und 0.5 mM Cystein, Methionin, reduziertes Glutathion, Sulfit, Sulfid und O-Acetylserin gegeben. Die Sulfataufnahme wurde über 12 h verfolgt.

Die Proben wurden im Eis-Kochsalz-Bad abgekühlt, zentrifugiert und die Radioaktivität im Überstand gemessen.

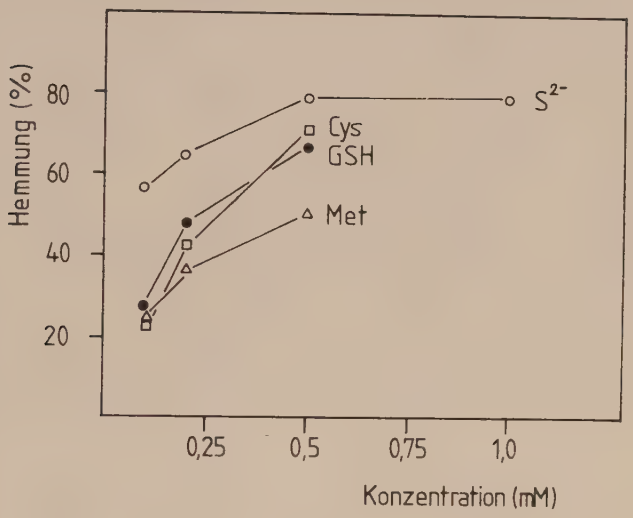

Abb. 19 : Hemmung der Sulfataufnahme in Rps. sulfidophila W_4 durch Sulfid, Glutathion (GSH), Cystein (Cys) und Methionin (Met).
(% Hemmung nach 10 h Inkubationszeit gegenüber einem Kontrollexperiment)

In allen Fällen war die Sulfataufnahme mit Zusätzen reduzierter Schwefelverbindungen und O-Acetylserin geringer als in einem Kontrollexperiment ohne Zusatz. Mit zunehmender Konzentration an Glutathion, Cystein, Methionin, Sulfit und Sulfid verstärkte sich der Hemmeffekt auf die Sulfataufnahme. Im Gegensatz dazu stieg die Sulfataufnahme mit steigender O-Acetylserin-Konzentration an und war mit 0.5 mM O-Acetylserin in den ersten Stunden höher als im Kontrollexperiment. Die Beziehung zwischen Hemmung und Konzentration der eingesetzten Verbindungen ist in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt. Der Hemmeffekt ist mit Sulfid besonders im Bereich niedriger Konzentrationen verglichen

mit den anderen Verbindungen am größten und mit Methionin am geringsten. Das Ausmaß der Hemmung ist bei Cystein, Glutathion und Sulfit (nicht dargestellt) in allen Konzentrationen sehr ähnlich.

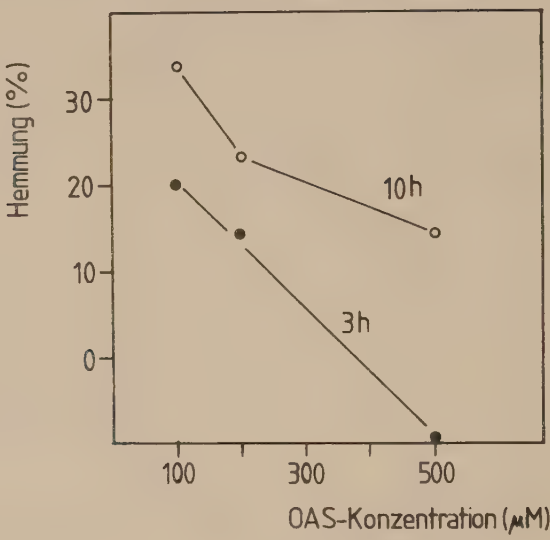

Abb. 20 : Einfluß von O-Acetylserin auf die Sulfataufnahme in Rps. sulfidophila W_4 nach 3 h und 10 h Inkubationszeit.
(% Hemmung bzw. Aktivierung gegenüber einem Kontrollexperiment)

In Abbildung 21 ist beispielhaft der Verlauf der Sulfataufnahme in dem mit Cysteinzusatz durchgeführten Experiment dargestellt. Der Kurvenverlauf ist auch in den anderen Experimenten, einschließlich der mit O-Acetylserin durchgeführten, sehr ähnlich. Besonders fällt die stets beobachtete wechselnde Aufnahme und Ausscheidung des Sulfats auf, mit Maxima der Aufnahme nach 2, 3, 5, 7 und 10 h. Dieses Verhalten wird als Regulationsphänomen des gesamten sulfatreduzierenden Enzymsystems gesehen, nicht nur der Sulfatpermease.

Dieser Effekt konnte in einem ähnlichen Experiment mit Zellen, die auf 0.25 mM Sulfat vorkultiviert waren, bei 0.1 mM Sulfat in der Testkultur nicht beobachtet werden, ist also von der Sulfatkonzentration abhängig und tritt möglicherweise nur in sulfatverarmten Zellen auf. Mit 0.1 mM Glutathion und Sulfit wurde 0.5-1.5 h nach ihrer Zugabe eine geringe Ausscheidung von Sulfat beobachtet, die anschließend in eine deutlich langsamere Sulfataufnahme (gegenüber der Rate ohne Zusatz) überging. Bei der Zugabe von 0.1 mM Cystein und O-Acetylserin hörte die Sulfataufnahme etwas verzögert erst nach 1-2 h auf, setzte danach aber mit O-Acetylserin wieder mit unverminderter Geschwindigkeit ein. Eine Ausscheidung von Sulfat wurde mit O-Acetylserin nicht beobachtet. Nur mit Sulfid findet ohne zeitliche Verzögerung eine direkte Verminderung der Sulfataufnahme statt.

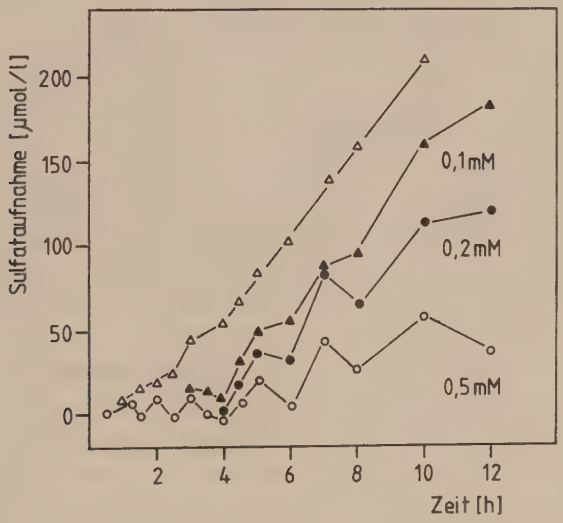

Abb. 21 : Einfluß verschiedener Cysteinkonzentrationen auf die Sulfataufnahme in sulfatverarmten Zellen von Rps. sulfidophila W_4

3. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, daß die reduzierten Schwefelverbindungen Cystein, Methionin, Glutathion, Sulfit und Sulfid die Sulfataufnahme hemmen. Ein direkter Einfluß auf die Sulfatpermease kann aber ausgeschlossen werden, da der Effekt mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 0.5-1 h eintritt. Nur Sulfid wirkt möglicherweise direkt auf die Sulfatpermease. Ob die Sulfatpermease wie die sulfatassimilierenden Enzyme (siehe: Regulation) durch Cystein reprimiert und durch O-Acetylserin dereprimiert wird, geht aus den hier durchgeführten Experimenten nicht hervor.

O-Acetylserin, dessen dereprimierende Wirkung für die Sulfatassimilation in Enterobacteriaceae bekannt ist und das auch in den untersuchten Rhodospirillaceae in gleicher Weise wirkt (siehe Kapitel: Regulation), zeigt in niedrigen Konzentrationen dieselben Hemmeffekte in der Sulfataufnahme wie die reduzierten Schwefelverbindungen.

Da O-Acetylserin die direkte Vorstufe des Cysteins ist, wird es in Anwesenheit des Schwefeldonators für die Reaktion der O-Acetylserin-Sulfhydrylase in Cystein umgewandelt, das sowohl Hemmung als auch Repression bewirkt. Bei den geringen Konzentrationen an O-Acetylserin in den hier durchgeführten Experimenten ist die Umwandlung eines großen Anteils des eingesetzten O-Acetylserins in Cystein rasch möglich, so daß der dereprimierende Effekt gegenüber dem reprimierenden nicht zum Tragen kommt. In Einklang mit dieser Vorstellung sind die Beobachtungen, daß der Hemmeffekt mit höheren O-Acetylserinkonzentrationen abnimmt, daß in den ersten Stunden nach der O-Acetylserinzugabe die Hemmung niedriger ist als später und daß O-Acetylserin in der gleichen Konzentration wie die anderen Verbindungen zugegeben 0.5 h später zu einem Stop der Sulfataufnahme im Gegensatz zu einer geringen Sulfatausscheidung mit Cystein führt.

O-Acetylserin führt zunächst zu einer Erniedrigung des Pools an gebundenem Sulfid und aktiviert dadurch die Sulfatreduktion. Dadurch erhöht sich dann die Cysteinkonzen-

tration. Da Cystein wahrscheinlich die O-Acetylserin-Sulfhydrylase hemmt, wird trotz ausreichendem O-Acetylserinangebot kein gebundenes Sulfid mehr umgesetzt. Gebundenes Sulfid häuft sich an, und es kommt als Folge davon zu einem Mangel an Kofaktor für die Sulfotransferase. PAPS und APS häufen sich an; es findet keine Sulfataktivierung mehr statt, und es wird kein Sulfat mehr aufgenommen bzw. Sulfat ausgeschieden. Ein ähnlicher Mechanismus ist wahrscheinlich für die in Abb. 21 dargestellte Aufnahme und Ausscheidung von Sulfat verantwortlich, die dann auftreten, wenn sulfatverarmten Zellen gleichzeitig Sulfat und eine reduzierte Schwefelverbindung angeboten wird.

Im Hinblick auf den Befund, daß Rps. sulfidophila zwei unterschiedliche apparente K_m-Werte für die Sulfataufnahme hat, stellt sich die Frage, ob zwei verschiedene Enzyme existieren oder ob sich die Eigenschaften einer Permease in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration derart ändern. In diesem Zusammenhang ist auch die Frage nach der Regulation der Synthese dieser(s) Enzyme(s) und ihrer unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften von Interesse, ganz besonders deswegen,weil Rps. sulfidophila ein Organismus ist, der sowohl photoautotroph mit Sulfid als Elektronendonator und einziger Schwefelquelle als auch photoheterotroph mit organischen Elektronendonatoren und Sulfat oder reduzierten Schwefelverbindungen als Schwefelquelle wachsen kann. Diese Fragen müssen in weiteren Experimenten geklärt werden.

V Regulation der Sulfatassimilation

Über die Regulation der sulfatassimilierenden Enzyme in Pflanzen ist bekannt, daß H_2S, Cystein und Methionin im Medium die Enzymsysteme hemmen. Zellen von Lemna minor L. (Wasserlinse) verlieren bei Wachstum auf H_2S oder Cystein rasch ihre Aktivität der APS-Sulfotransferase (Brunold und Schmidt, 1976; 1978). Einen direkten Einfluß auf das Enzym in vitro haben H_2S und Cystein jedoch nicht, Methionin und Glutathion ebenso wenig. In Zellkulturen von Catharantus roseus (L.) G. Don findet offensichtlich durch Cystein eine Repression der GSH-abhängigen APS-Sulfotransferase und der ATP-Sulfurylase statt, auch wenn die Autoren ihre Ergebnisse anders interpretieren (Schwenn et al., 1979). Die beobachteten Aktivitätssteigerungen können sehr gut mit dem Verbrauch des eingesetzten Cysteins (0.5 und 1.0 mM) nach 2 bzw. 5 Tagen zusammenfallen und sind dann als Derepression eine Folge des Cysteinverbrauches. Dafür spricht auch, daß die Aktivitätssteigerung mit der höheren Cysteinkonzentration später einsetzt und wesentlich schwächer ausfällt.

In E. coli und Salmonella typhimurium findet eine koordinierte Repression von ATP-Sulfurylase und APS-Kinase bei Wachstum auf Cystein statt. Mit Ausnahme der Serintransacetylase sind auch die anderen an der Cysteinsynthese beteiligten Enzyme reprimiert. O-Acetylserin dereprimiert alle an der Cysteinsynthese beteiligten Enzyme einschließlich der Serintransacetylase, der O-Acetylserin-Sulfhydrylase und der Sulfatpermease (Jones-Mortimer et al., 1968).

Die Rolle des Glutathions in der Sulfatassimilation ist offensichtlich in verschiedenen Organismen sehr unterschiedlich. In Bacillus subtilis hat Glutathion im Gegensatz zu den Verhältnissen bei E. coli einen reprimierenden Effekt (Pasternak et al., 1965). In E. coli wurden mit Glutathion als Schwefelquelle die niedrigsten Cysteinkonzentrationen in den Zellen gefunden, mit Cystein als Schwefelquelle die höchsten. Der Funktion des Cysteins als Korepressor ent-

sprechend sind auch die Aktivitäten der ATP-Sulfurylase, APS-Kinase, PAPS-Reduktase und Sulfitreduktase in den auf Glutathion gewachsenen Zellen am höchsten (Pasternak et al., 1965; Wheldrake und Pasternak, 1965). Da Cystein die O-Acetylserin-Sulfhydrylase reprimiert und die Serintransacetylase hemmt (Kredich, 1971), wird durch Glutathion gleichzeitig die O-Acetylserinkonzentration in der Zelle erhöht.

1. Wachstum auf verschiedenen Schwefelquellen

Die meisten Rhodospirillaceae können Sulfat als Schwefelquelle nutzen, aber auch auf reduzierten Schwefelquellen wachsen. Es wurden in 5 selbst isolierten Stämmen, 3 Stämmen, von denen bekannt war, daß sie nicht auf Sulfat wachsen - Rps. globiformis (Pfennig, 1974), Rps. sulfoviridis (Keppen und Gorlenko, 1975) und Rps. spec. 51 (Hansen, 1974) - sowie in dem Typenstamm von Rps. sulfidophila W_4 die Verwertung der reduzierten Schwefelverbindungen Thiosulfat, Sulfit, Sulfid, Cystein und Glutathion getestet. Außerdem wurde der Einfluß von O-Acetylserin und Glutathion auf das Wachstum mit Sulfat untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Neben Rps. globiformis, Rps. sulfoviridis und Rps. spec. 51 ist offensichtlich auch Rps. spec. 6II in der Assimilation des Sulfates gestört. Rps. sulfoviridis P_1 kann nur auf Glutathion, Cystein und Sulfid wachsen; mit Cystein wächst er am besten. Sulfat hemmt das Wachstum auf Glutathion. Vermutlich ist in diesem Organismus das sulfitreduzierende Enzym nicht vorhanden oder fehlreguliert. Ähnlich verhält sich Rps. spec. 51, der aber zusätzlich auf Thiosulfat wachsen kann.

Rps. spec. 6II kann auf Sulfat nur schlecht wachsen, aber besser, wenn zusätzlich Glutathion angeboten wird. Dieser Stamm wächst unter diesen Bedingungen sogar am besten, besser als mit Glutathion allein und besser als auf

den anderen reduzierten Schwefelverbindungen. Dies läßt vermuten, daß Glutathion nicht nur als Schwefelquelle dient, sondern auch einen regulatorischen Einfluß auf die Sulfatassimilation hat, etwa wie in E. coli.

Auch in Rps. globiformis ist das Wachstum unter den getesteten Bedingungen am besten mit Sulfat in Gegenwart von Glutathion oder O-Acetylserin. Sulfid und Sulfit hemmen in der eingesetzten Konzentration und auch Glutathion kann nicht gut verwertet werden. In einem Kontrollversuch wurde sehr gutes Wachstum mit weniger als 0.1 mM Sulfat beobachtet. Diese Daten sprechen für eine Fehlregulation der Sulfatassimilation bzw. einer Limitierung der Cysteinsynthese durch die O-Acetylserin-Konzentration. Die Zugabe von O-Acetylserin zum Medium führt daher zu einer deutlichen Wachstumssteigerung, und Glutathion kann, wenn es wie in E. coli wirkt (Pasternak, 1962; Wheldrake, 1967), über eine Erniedrigung der Cysteinkonzentration denselben Effekt haben. Das könnte bedeuten, daß eine zu hohe intrazelluläre Cysteinkonzentration bei Wachstum auf Sulfat (besonders bei höheren Konzentrationen) zu einer Repression der sulfatassimilierenden Enzyme führt.

Alle anderen Stämme kann man in ihrer Verwertung von verschiedenen Schwefelverbindungen als normal bezeichnen. Sie wachsen am besten mit Cystein oder Glutathion, wachsen aber auch auf den anderen Schwefelquellen einschließlich Sulfat nicht wesentlich schlechter. O-Acetylserin hat hier stets einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum; Glutathion hemmt das Wachstum auf Sulfat nur in R. tenue.

Tabelle 13 : Wachstum einiger Rhodospirillaceae auf verschiedenen Schwefelquellen (Angaben in % maximalen Wachstums)

Schwefelquelle	R. ten.	Rps. spec.		Rps. sulfid.		Rps. spec.		Rps. sulfov.	Rps. glob.
	230	992	985	982	W_4	51	6II	P_1	7950
Sulfat	94	89	92	96	96	--	43	--	71
" + OAS	89	85	91	87	93	--	32	--	95
" + GSH	88	99	100	96	98	54	100	41	95
" +GSH+OAS	84	91	98	91	96	48	83	31	84
Sulfit	88	95	97	94	96	--	73	--	--
Thiosulfat	86	96	98	99	96	89	84	--	70
Sulfid	63	92	92	97	94	97	79	82	--
Cystein	63	97	96	100	97	100	85	100	90
GSH	100	100	98	99	100	43	82	79	27

Kulturen von R. tenue (R. ten.) BN 230, Rps. spec. 992 und 985, Rps. sulfidophila (Rps. sulfid.) 982 und W_4, Rps. spec. 51 und 6II, Rps. sulfoviridis (Rps. sulfov.)P_1 und Rps. globiformis (Rps. glob.) 7950 wurden in 50 ml-Flaschen in schwefelfreiem Medium (siehe Material und Methoden) mit den angegebenen Zusätzen über 3 bis 4 Passagen bebrütet. Die Trübung bei 650 nm wurde gemessen und die Mittelwerte sind in der Tabelle 13 in % des Maximalwertes angegeben. Bei Rps. globiformis war das beste Wachstum bei unter 0.1 mM Sulfat. (OAS: O-Acetylserin; -- : kein Wachstum)

2. Regulation der Enzymsynthese

Experimente zur Derepression wurden durchgeführt, um einen Einblick in die Regulationsmechanismen zu gewinnen und die Beteiligung der getesteten Enzyme an der Sulfatassimilation zu bestätigen. Die Ergebnisse wurden außerdem dazu benutzt, die spezifische Aktivität der Enzyme in dem für Anreicherungsversuche verwendeten Zellmaterial zu erhöhen.

Die Experimente wurden an R. tenue BN 230, Rps. gelatinosa BN 151, R. rubrum S_1, Rps. globiformis 7950 und Rps. sulfidophila W_4 durchgeführt. Die Zellen wurden sulfatlimitiert vorkultiviert, vor der Hauptkultur 2 h mit 2 mM Cystein inkubiert, in sulfatfreiem Medium gewaschen und dann in der Hauptkultur mit 1 mM O-Acetylserin bei 5000-10000 Lux, 28°C unter N_2 im Fermenter F III bebrütet. Die Zellanfangsdichte betrug zwischen 1.5-2.0 g Feuchtgewicht / l. Über 10-14 h wurden Proben entnommen, abzentrifugiert und das Zellmaterial wurde eingefroren. In den Extrakten dieser Zellen wurden die Enzyme ATP-Sulfurylase, APS-Kinase, APS- bzw. PAPS-Sulfotransferase und Thiosulfonatreduktase nachgewiesen. Die Ergebnisse für Rps. sulfidophila, R. rubrum und R. tenue sind in den Abbildungen 22-24 dargestellt.

In Rps. sulfidophila zeigt die PAPS-Sulfotransferase nach 2 h die höchste Aktivität (104 µEinheiten / mg Protein) und hat ein zweites niedrigeres Maximum nach 7.5 h. Die anderen Enzyme zeigen einen ähnlichen Aktivitätsverlauf; die Aktivitätssteigerung ist jedoch bei der APS-Kinase und Thiosulfonatreduktase sehr schwach und steigt bei der ATP-Sulfurylase erst nach 4 h richtig an. Die absoluten Aktivitäten der Enzyme unterscheiden sich in Größenordnungen. Die nach 2 h gefundenen Aktivitäten sind pro mg Protein 49 mE ATP-Sulfurylase, 20 mE APS-Kinase, 0.1 mE Sulfotransferase und 0.016 mE Thiosulfonatreduktase. Der Aktivitätsverlauf der Reaktionen vom Sulfat bis zur Stufe des Sulfit (nicht dargestellt) ist mit der Kurve für die Sulfotransferase auch quantitativ nahezu identisch, was bedeutet, daß dies die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion ist.

In einem ähnlichen Experiment, in dem statt O-Acetylserin 1 mM Djenkolsäure eingesetzt wurde, wurde eine wesentlich schwächere Aktivitätssteigerung der untersuchten Enzyme beobachtet.

Durch Sulfid wird die Synthese der sulfatassimilierenden Enzyme reprimiert. Im Vergleich zu der Aktivität in Zellen, die auf Sulfat als einziger Schwefelquelle gewachsen waren, betrug die Aktivität der PAPS-Sulfotransferase bei Zusatz von 0.05% Hefeextrakt noch 70%, in autotroph mit Sulfid gewachsenen Zellen nur noch 12%. Die Reduktionsrate vom Sulfat bis zur Stufe des Sulfits betrug mit Hefeextrakt 37% und war in autotroph gewachsenen Zellen nicht nachweisbar.

In R. rubrum S_1 ist die Derepression der ATP-Sulfurylase offensichtlich koordiniert mit der von APS-Kinase und PAPS-Sulfotransferase, wie der gleichsinnige Aktivitätsverlauf der Abbildung 23 zeigt. Die maximale Aktivität ist erst nach 8 h erreicht.

In R. tenue wurden die sulfatausgehungerten Zellen zur Startzeit mit 0.5 mM Cystein versetzt und nach 2 h wurden in diese Zellkultur 2 mM O-Acetylserin zugegeben. Offensichtlich bewirkt Cystein unter diesen Bedingungen eine Derepression, die Zugabe von O-Acetylserin eine weitere Aktivitätssteigerung. Während die APS-Sulfotransferase und die Thiosulfonatreduktase 2 h nach der O-Acetylserin-Zugabe ihre Maxima haben und auch sonst einen ähnlichen Kurvenverlauf zeigen, steigt die Aktivität der ATP-Sulfurylase erst 3 h später auf ihr Maximum. Die Aktivität der Gesamtreduktion vom Sulfat bis zur Stufe des Sulfits läuft nahezu parallel zur Aktivität der APS-Sulfotransferase, liegt aber anfangs darunter und mit steigender ATP-Sulfurylase-Aktivität dann leicht darüber (Abb. 24).

In einem Experiment mit Rps. gelatinosa wurden ähnliche Ergebnisse wie bei R. tenue gefunden. Hier konnte auch für die S-Sulfocysteinsynthase (0.46 E/mg Protein) und die Cysteinsynthase (26 E/mg Protein, Daten von G. Hensel) ein

ähnlicher Aktivitätsverlauf wie bei der APS-Sulfotransferase und ATP-Sulfurylase gefunden werden.

Auch in Rps. globiformis wurde eine schwache Aktivitätssteigerung mit O-Acetylserin gefunden. Die Steigerung von APS-Sulfotransferase und Thiosulfonatreduktase war etwa dreifach. In Zellen, die auf Thiosulfat, Cystein, Sulfat mit und ohne Hefeextrakt gewachsen waren, wurde die höchste Aktivität der Sulfotransferase und Thiosulfonatreduktase mit Thiosulfat (1.8 bzw. 600 µE/mg Protein) und Cystein (1.2 bzw. 660 µE/mg Protein)gefunden, die niedrigste mit Sulfat (0.14 bzw. 160 µE/mg Protein). Mit Hefeextrakt im Medium sind die Aktivitäten 0.41 µE/mg Protein Sulfotransferase und 160 µE/mg Protein Thiosulfonatreduktase. Mit O-Acetylserin wurden zwischen 10-30 µE APS-Sulfotransferase und 150-500 µE Thiosulfonatreduktase pro mg Protein gefunden.

In Rps. sulfidophila W_4 ist die Aktivität der PAPS-Sulfotransferase am höchsten in Zellen, die in Gegenwart von O-Acetylserin angezogen wurden und beträgt mit Sulfat oder Djenkolsäure nur etwa die Hälfte davon. Eine schwache Aktivität dieses Enzymes wird mit Sulfid, Sulfit, Thiosulfat, Glutathion und Cystein gefunden. Ähnlich verhält sich die Thiosulfonatreduktase. Die APS-Kinase ist am stärksten reprimiert mit Sulfit und Sulfid, zeigt aber hohe Aktivitäten mit Cystein und Glutathion.

In Rm. vannielii 17100 ist die APS-Kianse nur in Zellen nachweisbar, die mit O-Acetylserin gewachsen waren. Die Enzyme APS-Sulfotransferase und Thiosulfonatreduktase zeigen mit Sulfat, O-Acetylserin, Thiosulfat und Sulfit hohe Aktivitäten und sind mit Sulfid, Cystein und Glutathion reprimiert.

3. Diskussion

Die Experimente zeigen, daß O-Acetylserin in allen Stämmen eine Derepression der sulfataktivierenden und der sulfatre-

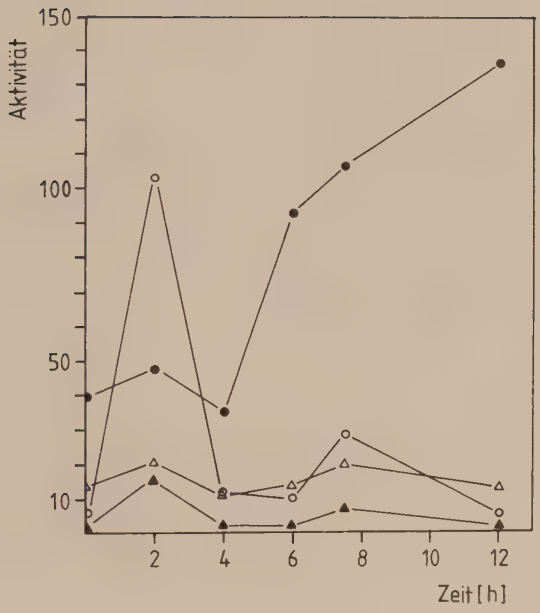

Abb. 22 : Derepression sulfatassimilierender Enzyme durch O-Acetylserin in Rps. sulfidophila W_4.
● : ATP-Sulfurylase (Aktivität in mE/mg Protein)
Δ : APS-Kinase (Aktivität in mE/mg Protein)
o : PAPS-Sulfotransferase (Akt. in µE/mg Protein)
▲ : Thiosulfonatreduktase (Akt. in µE/mg Protein)

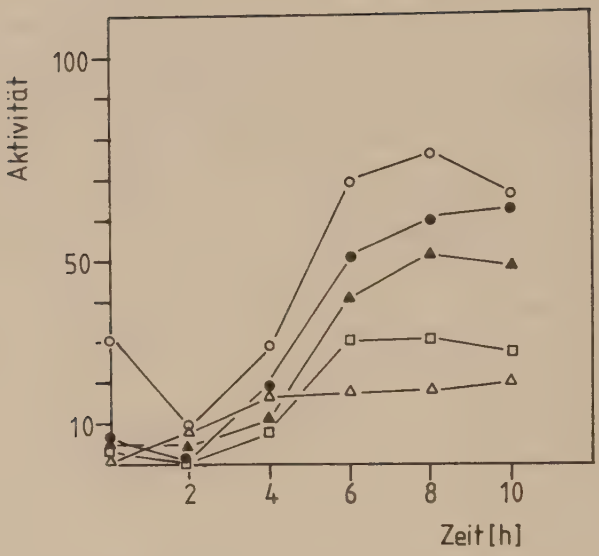

Abb. 23 : Derepression sulfatassimilierender Enzyme durch O-Acetylserin in R. rubrum S_1

- o : ATP-Sulfurylase (Aktivität in mE/mg Protein)
- ● : PAPS-Sulfotransferase (Akt. in µE/mg Protein)
- ▲ : Reduktion von Sulfat zu Sulfit (Akt. in µE/mg Protein)
- □ : Reduktion von APS zu Sulfit (Akt. in µE/mg Pr.)
- △ : APS-Kinase (Akt. in 1/10 mE/mg Protein)

reduzierenden Enzyme hervorruft. Der Mechanismus dieser Derepression scheint aber unterschiedlich zu sein.

So werden in R. rubrum ATP-Sulfurylase und PAPS-Sulfotransferase koordiniert synthetisiert. Der rasche Anstieg der Sulfotransferaseaktivität, der bei den anderen Stämmen beobachtet wurde, tritt hier nicht auf.

In Rps. sulfidophila und R. tenue erfolgt nach Zugabe des O-Acetylserin innerhalb von 2 h ein rascher Anstieg der Sulfotransferaseaktivität, die aber anschließend wieder stark abfällt. Der Aktivitätsanstieg der ATP-Sulfurylase erfolgt

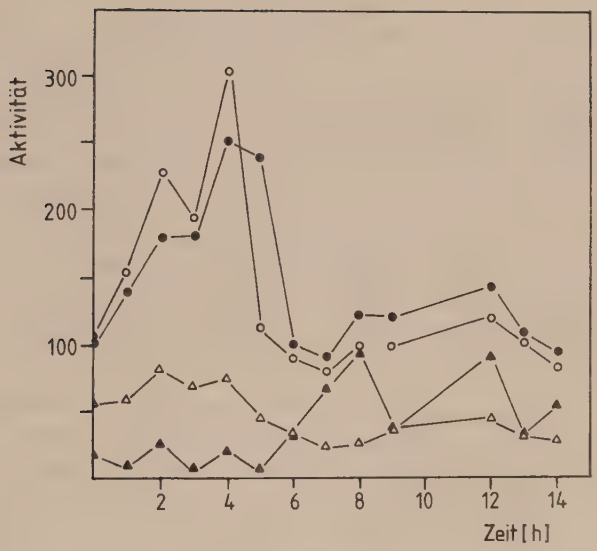

Abb. 24 : Derepression sulfatassimilierender Enzyme durch O-Acetylserin in R. tenue 230
o : APS-Sulfotransferase (Aktivität in µE/mg Pr.)
● : Reduktion von Sulfat zu Sulfit (Akt. in µE/mg Protein)
▲ : ATP-Sulfurylase (Akt. in mE/mg Protein)
Δ : Thiosulfonatreduktase (Akt. in µE/ mg Pr.)

erst wesentlich später, ähnlich, wie in R. rubrum. Es wird deshalb vermutet, daß die Regulation über verschiedene Mechanismen erfolgt. Ein rascher Aktivitätsanstieg ist zurückzuführen auf den beschleunigten Umsatz des gebundenen Sulfids und dadurch bedingt einer Erhöhung der Konzentration an reduziertem Kofaktor, der die Sulfotransferase aktiviert. Gleichzeitig bewirkt das O-Acetylserin möglicherweise eine verstärkte Synthese des Kofaktorsystems (siehe : Allgemeine Diskussion). Eine Derepression der Enzyme, die direkt an der Cysteinsynthese beteiligt sind ist eine Folge der herabgesetzten Konzentration an gebundenem Sulfid. Dieser Vorgang läuft langsamer ab und ist erkenntlich an der Zunahme der ATP-Sulfurylaseaktivität.

ALLGEMEINE DISKUSSION

Nicht alle Bakterien sind in der Lage, Sulfat zu assimilieren und als einzige Schwefelquelle zu nutzen. So sind z.B. alle methanogenen Bakterien auf reduzierte Schwefelverbindungen wie Sulfid oder Cystein angewiesen (Zeikus, 1977). Von den phototrophen Bakterien sind alle Chlorobiaceae und die meisten Chromatiaceae nicht fähig, Sulfat zu assimilieren. Aus der Familie der Rhodospirillaceae können die meisten, aber nicht alle, Stämme auf Sulfat als einziger Schwefelquelle wachsen.

In Rps. sulfoviridis und Rps. spec. 51 kann das Unvermögen, auf Sulfat und Sulfit zu wachsen, mit dem Fehlen einer Thiosulfonatreduktase erklärt werden. Rps. globiformis und Rps. spec. 6 II wachsen nur schlecht auf Sulfat, aber viel besser, wenn zusätzlich reduziertes Glutathion oder O-Acetylserin angeboten wird. Es wird deshalb vermutet, daß in diesen Stämmen Defekte in der Synthese des O-Acetylserin bzw. des Kofaktors oder dessen reduzierenden Systems liegen.

Die absoluten Aktivitäten der an der Sulfatassimilation beteiligten Enzyme zeigen starke Unterschiede in verschiedenen Organismen. So ist die spezifische Aktivität der PAPS-Sulfotransferase in E. coli K_{12} 223 µE, in Rps. sulfidophila 1999 6 µE und in R. rubrum HA 1.5 µE; die spezifische Aktivität der APS-Sulfotransferase in Ps. aeruginosa 287 µE und in Rc. purpureus 6770 nur 1 µE. Man kann daher annehmen, daß in einigen Stämmen mit niedriger Aktivität der sulfatassimilierenden Enzyme bei Wachstum mit Sulfat als einziger Schwefelquelle dieses das Wachstum limitiert. Diese Stämme sind offensichtlich besser an das Wachstum mit reduzierten Schwefelverbindungen adaptiert. Dazu gehören neben einigen Stämmen von Rps. sulfidophila und Rps.spec. 992 und 985, auch Rc. purpureus, R. molischianum und R. photometricum.

Die Aktivitäten der verschiedenen an der Cysteinsynthese beteiligten Enzyme zeigen aber auch bei demselben Organismus große Unterschiede. So wurde in Zellen von E. coli, die auf Sulfat gewachsen waren, eine spezifische Aktivität von 1.7 mE der sulfataktivierenden Enzyme (ATP-Sulfurylase und APS-Kinase), 0.2 mE PAPS-Sulfotransferase, 4.6 mE Thiosulfonatreduktase, 6.2 mE Serintransacetylase und 5.9 E O-Acetylserinsulfhydrylase gefunden (Jones-Mortimer et al., 1968). In der gleichen Größenordnung liegen die Enzymaktivitäten in auf Sulfat gewachsenen Zellen von Salmonella typhimurium (Kredich, 1971).

In den zur Derepression durchgeführten Experimenten dieser Arbeit wurden in Rps. sulfidophila nach 2 h spezifische Aktivitäten von 49 mE ATP-Sulfurylase, 20 mE APS-Kinase, 0.1 mE PAPS-Sulfotransferase und 0.016 mE Thiosulfonatreduktase gefunden. Bei Rps. gelatinosa wurden maximale spezifische Aktivitäten von 34 mE ATP-Sulfurylase, 0.012 mE APS-Sulfotransferase, 0.5 E S-Sulfocysteinsynthase und 24 E O-Acetylserinsulfhydrylase gefunden; bei R. rubrum waren 77 mE ATP-Sulfurylase, 1.3 mE APS-Kinase und 0.06 mE PAPS-Sulfotransferase die höchsten Aktivitäten.

Diese enormen Aktivitätsunterschiede bei allen bisher untersuchten Organismen lassen natürlich zunächst einmal die Frage nach methodischen Unzulänglichkeiten bei den Enzymtests aufkommen. Mögliche prinzipielle Fehlerquellen sollen im folgenden kurz diskutiert werden.

Schwierigkeiten des ATP-Sulfurylase-Test beruhen darauf, daß APS in sehr geringen Konzentrationen bereits hemmt (K_i= 4 x 10^{-5}M in Penicillium chrysogenum, K_i= 8 x 10^{-7}M in Rps. sulfidophila, Tweedie und Segel, 1971; Cooper, 1979). Deshalb wird zur Aktivitätsbestimmung meist die Rückwärtsreaktion getestet oder Molybdat als Substrat eingesetzt. Der Test mit Molybdat wurde auch in dieser Arbeit benutzt, liefert aber verglichen mit den in der Zelle möglichen Raten zu hohe Werte.

Die APS-Kinase-Reaktion ist nur für kurze Zeit linear, da auch sie möglicherweise von ihrem Produkt gehemmt wird.

Daher wurde je nach Aktivität die PAPS-Konzentration in den Tests nach Inkubationszeiten von 1-10 min gemessen. Diese Werte dürften den maximal möglichen Umsatzraten sehr nahekommen.

Anders ist die Situation bei den Sulfotransferasen. Wie bei der APS-Kinase ist auch bei diesen Enzymen mit 100 µM das Substrat sicher kein begrenzender Faktor (K_m-Werte werden in der Größenordnung von 1-20 µM erwartet; bei Spinat wurde ein K_m-Wert von 13 µM und bei Synechococcus 6301 von 20 µM gefunden; Schmidt, 1976; Schmidt und Christen, 1978), jedoch kann hier das Enzym durch einen im Extrakt vorhandenen Inaktivator oder das Fehlen eines notwendigen Aktivators nur teilweise aktiv sein. Als Aktivator kommt die oxidierte oder reduzierte Form des im Testansatz benötigten Kofaktors in Frage, die auch für den sigmoiden Kurvenverlauf der Proteinabhängigkeit in R. rubrum und Rps. sulfidophila verantwortlich gemacht wird. Mögliche Inaktivatoren sind die S-Sulfoform oder die Disulfidform des Kofaktors oder Cystein. Daher ist es durchaus möglich, daß die maximalen Umsatzraten der Sulfotransferasen teilweise höher liegen als die gemessenen Aktivitäten.

Die Thiosulfonatreduktase wird sehr wahrscheinlich durch ihr Reaktionsprodukt, das gebundene Sulfid, stark gehemmt. Sie ist daher im Test nur teilweise aktiv.

Die über mehr als drei Zehnerpotenzen höheren Aktivitäten der O-Acetylserinsulfhydrylase sind schwer verständlich und für ein assimilatorisch wirksames Enzym sehr ungewöhnlich. Wegen seines Vorkommens in vielen Bakterien und auf Grund von Mechanismen, durch die es reguliert wird, wird ihm eine wesentliche Rolle in der Assimilation des Sulfats zugeschrieben (Hensel, 1979).

Ein weiteres Enzym, die Serinsulfhydrase, die die Bildung von Cystein aus Serin und H_2S katalysiert, ist in verschiedenen Bakterien mit 0.1-1% der Aktivität der O-Acetylserinsulfhydrylase nachgewiesen worden. Wegen der im Vergleich zur O-Acetylserinsulfhydrylase niedrigen Aktivität wird für die Serinsulfhydrase aber eine untergeordnete

Rolle in der Cysteinsynthese angenommen. Von beiden Enzymen ist nicht bekannt, ob sie nur freies Sulfid oder auch gebundenes Sulfid umsetzen.

Hinsichtlich des Vorkommens von APS- bzw. PAPS-Sulfotransferase bei den Arten der Rhodospirillaceae wurde festgestellt, daß Arten, die als phylogenetisch nahe verwandt angesehen werden, das gleiche Substrat verwenden. Rps. capsulata, Rps. sulfidophila und Rps. sphaeroides haben eine PAPS-Sulfotransferase und außerdem reduzieren Rps. viridis, Rps. palustris, R. rubrum und R. fulvum PAPS. Die Verhältnisse bei R. rubrum sind nicht ganz klar. Während in dieser Arbeit bei den Stämmen S_1 und HA eine Reduktion über PAPS nachgewiesen werden konnte, berichtet Schmidt (1977a) über die Anreicherung einer APS-Sulfotransferase aus R. rubrum 1761-1a. Ob diese Unterschiede stammspezifisch sind (nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist dies unwahrscheinlich), ob Stamm 1761-1a nicht zur Art R. rubrum gehört, ob während der Anreicherung die PAPS-Sulfotransferase Aktivität verloren ging, oder ob andere Ursachen für diese Diskrepanz existieren, ist noch unklar. R. tenue, Rps. gelatinosa und Rc. purpureus haben eine APS-Sulfotransferase und ebenso reduzieren Rps. acidophila, Rm. vannielii und Rps. globiformis APS.

Aus der Ähnlichkeit der Cytochrom c_2 Strukturen und der Basensequenzen der 23S ribosomalen RNS (Ambler et al., 1979; Gibson et al., 1979) wird eine nahe Beziehung zwischen Paracoccus denitrificans und Rps. capsulata, die beide PAPS reduzieren, und zwischen Alkaligenes und R. tenue, die beide APS reduzieren, abgeleitet.

Auf Grund der Eigenschaften der Sulfotransferasen, insbesondere der Molekulargewichte, der isoelektrischen Punkte sowie des Verhaltens in einigen nicht aufgeführten Anreicherungsversuchen der Sulfotransferasen kann angenommen werden, daß der Reaktionsmechanismus bei allen APS-Sulfotransferasen sehr ähnlich ist, sich aber grundsätzlich von dem der PAPS-Sulfotransferase unterscheidet. Während erstere eine Dialyse ohne allzu großen Aktivitätsverlust überstand-

den, bei Lagerung im Kühlschrank auch noch nach einigen Wochen Aktivität zeigten und nach Gelfiltration und isoelektrischer Fokussierung noch aktiv waren, konnte bei der PAPS-Sulfotransferase aus Rps. sulfidophila Aktivität nach Gelfiltration, Dialyse, isoelektrischer Fokussierung oder Lagerung nicht nachgewiesen werden. Von den getesteten Stabilisatoren hatte nur Glycerin (30%) einen geringen stabilisierenden Einfluß.

Es werden deshalb Reaktionsfolgen vorgeschlagen mit der direkten Beteiligung eines nicht dialysierbaren Kofaktors - wahrscheinlich Thioredoxin - in der von der APS-Sulfotransferase katalysierten Reaktion und mit der zusätzlichen Beteiligung eines dialysierbaren Kofaktors in der PAPS-Sulfotransferase-Reaktion.

Eine Folge der Reaktionen, die möglicherweise am Einbau des Sulfatschwefels in Cystein bei Rm. vannielii beteiligt sind, zeigt Abbildung 25:

Der Aktivierung des Sulfats zum APS folgt die Übertragung der Sulfogruppe auf einen enzymgebundenen Kofaktor. Dieser Kofaktor, der bei allen hier untersuchten APS-Sulfotransferasen möglicherweise ein Thioredoxin ist, wird als S-Sulfoverbindung von der Sulfotransferase freigesetzt und dient in dieser Form als Substrat für die Thiosulfonatreduktase. Diese setzt dann die Disulfidform des Kofaktors frei, die als Substrat für die O-Acetylserinsulfhydrylase dienen kann. Aus dieser Reaktion geht der Kofaktor in seiner oxidierten Form hervor, wird von einer Reduktase reduziert und in dieser Form wieder an die Sulfotransferase gebunden. Das im Testsystem verwendete DTE dient als Elektronendonator für diese Reduktion.

Etwas anders sieht die Reaktionsfolge bei Rps. sulfidophila aus (siehe Abbildung 26):

Die Aktivierung schließt hier die Reaktion der APS-Kinase ein. Die Übertragung der Sulfogruppe erfolgt ebenfalls auf ein enzymgebundenes Dithiol, das aber kein Thioredoxin

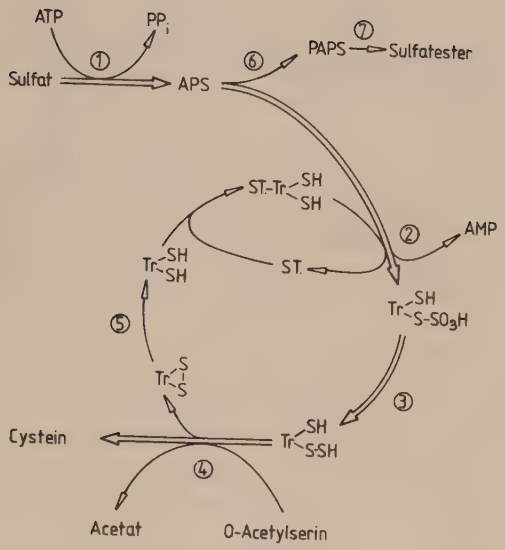

Abb. 25 : Cysteinsynthese in Rm. vannielii :

1: ATP-Sulfurylase, 2: APS-Sulfotransferase, 3: Thiosulfonatreduktase, 4: O-Acetylserinsulfhydrylase, 5: Thioredoxinreduktase, 6: APS-Kinase, 7: Sulfotransferasen, ST.: APS-Sulfotransferase, Tr.: Thioredoxin

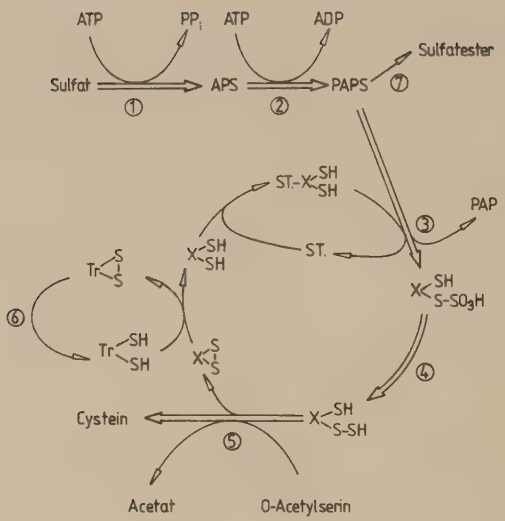

Abb. 26 : Cysteinsynthese in Rps. sulfidophila

1: ATP-Sulfurylase, 2: APS-Kinase, 3: PAPS-Sulfotransferase, 4: Thiosulfonatreduktase, 5: O-Acetylserinsulfhydrylase, 6: Thioredoxin-reduktase, 7: Sulfotransferasen, ST.: PAPS-Sulfotransferase, Tr.: Thioredoxin, X: Kofaktor

ist und durch Dialysememembranen diffundieren kann. Die S-Sulfoform dieses Kofaktors wird von der Thiosulfonatreduktase zur Disulfidform reduziert, die wiederum das Substrat für die O-Acetylserinsulfhydrylase darstellen kann. Die Reduktion des oxidierten Kofaktors übernimmt in diesem System reduziertes Thioredoxin oder ein Enzym, das reduziertes Thioredoxin als Elektronendonator verwendet. Der reduzierte Kofaktor bindet an die Sulfotransferase und überführt dieses Enzym damit gleichzeitig von einer inaktiven in eine aktive Form.

Eine ähnliche Reaktionsfolge wurde in Hefe gefunden (siehe Abbildung 3, Wilson und Bierer, 1976) und ist wahrscheinlich auch in E. coli vorhanden. Eine mögliche Rolle der Kofaktoren in der Regulation der Sulfatreduktion wird später diskutiert.

Zur Rolle des Thioredoxins im Zellstoffwechsel sollen noch einige Bemerkungen gemacht werden. Es spielt offensichtlich eine vielfältige Rolle. Zusammen mit einer NADPH-Thioredoxinreduktase bildet es ein System, das an der Reduktion der Ribonukleotide zu den Desoxyribonukleotiden in E. coli und Hefe beteiligt ist (Laurent et al., 1964; Porque et al., 1970a). Später wurde die Beteiligung dieses Systems an der Reduktion des Sulfats in Hefe gezeigt (Porque et al., 1970b). Die Isolierung eines Thiolphosphats des Thioredoxins aus E. coli deutet schließlich auf eine Bedeutung der phosphorylierten Form in der Übertragung von Phosphatgruppen hin (Pigiet und Conley, 1978). Bei der Vielfalt an möglichen Funktionen des Thioredoxins ist es durchaus denkbar, daß seine verschiedenen Formen auch in die Regulation des Zellstoffwechsels eingreifen. Im Hinblick darauf macht eine direkte Beteiligung des Thioredoxins als Kofaktor der sulfatreduzierenden Prozesse die Situation natürlich enorm kompliziert, da es neben seinen anderen Funktionen in der reduzierten Form, als S-Sulfoverbindung und als Disulfid Substrat und Regulator für verschiedene Enzyme der Cysteinsynthese sein kann.

Daher ist es wohl als Fortschritt zu bewerten, wenn die Funktion des Thioredoxins in der Sulfatreduktion auf die Reduktion des daran beteiligten Kofaktors beschränkt bleibt. Systeme der Sulfatreduktion mit Thioredoxin als direktem Kofaktor, wie sie bei den in dieser Arbeit untersuchten APS-reduzierenden Stämmen wahrscheinlich vorliegen, müssen daher als primitiver oder ursprünglicher angesehen werden.

Es konnte gezeigt werden, daß in Pflanzen (z.B. Lemna minor, Phaseolus vulgaris, Catharantus roseus) die APS-Sulfotransferase bei Wachstum mit Cystein, Methionin oder Sulfid reprimiert ist (z.B. Brunold und Schmidt, 1976, 1978; Schwenn et al., 1979; Wyss und Brunold, 1979). Eingehender untersucht wurde die Regulation der Cysteinsynthese in E. coli und Salmonella typhimurium (Dreyfuss und Monty, 1963a, 1963b; Ellis et al., 1964, Jones-Mortimer et al., 1968; Kredich, 1971; Pasternak, 1962; Pasternak et al., 1965; Wheldrake, 1967).

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß außer der Serintransacetylase alle Enzyme, die an der Synthese des Cysteins beteiligt sind, unter Schwefelmangelbedingungen und bei Wachstum mit O-Acetylserin dereprimiert, bei Wachstum mit Cystein als Schwefelquelle reprimiert sind. Die spezifische Aktivität dieser Enzyme nimmt mit steigender intrazellulärer Cysteinkonzentration ab. Bei Wachstum auf Sulfit sind zwar die sulfataktivierenden Enzyme fast vollständig reprimiert, die Sulfitreduktase ist aber nur wenig beeinflußt. In Mutanten, die keine Serintransacetylase haben, bleiben die Enzyme der Sulfatassimilation auf einem ganz niedrigen Aktivitätsniveau, wenn ihnen nicht O-Acetylserin angeboten wird.

Aus der genetischen Analyse einer Vielzahl von Mutanten ergibt sich folgendes Bild:
Neun Strukturgene sind an der Reduktion des Sulfats zu Sulfit beteiligt. Einzelne Gene wurden für die ATP-Sulfu-

rylase und die APS-Kinase gefunden. Die Reduktion von PAPS in Salmonella typhimurium scheint unter der Kontrolle von vier Strukturgenen zu stehen, und im PAPS reduzierenden System von Hefe (Wilson und Bierer, 1976) sind vier Proteinfraktionen gefunden worden. Das sulfitreduzierende System ist von sechs Strukturgenen abhängig. Drei der sechs Strukturgene für die Sulfitreduktion sind auch an der PAPS-Reduktion beteiligt. Die Autoren vermuten eine Beteiligung dieser drei Gene, die getrennt von den anderen an der Cysteinsynthese beteiligten Strukturgenen liegen, an der Regulation der Cysteinsynthese.

In all diesen Arbeiten wird von freien Intermediaten bei der Sulfatreduktion, d.h. SO_3^{2-} und S^{2-}, ausgegangen. Es soll hier postuliert werden, daß freies Sulfit und Sulfid normalerweise in der Zelle nicht auftreten und nur durch Manipulation oder bei gestörtem Reaktionsablauf freigesetzt werden. Exogen angebotenes Sulfid und Sulfit sowie Thiosulfat werden in der Zelle rasch in gebundene Formen überführt. Unter der Annahme von gebundenen Zwischenstufen der Sulfatreduktion und im Vergleich der genetischen Befunde mit der in Abbildung 3 oder Abbildung 26 dargestellten Reaktionsfolgen ergibt sich folgendes Bild für die genetische Kontrolle der Cysteinsynthese in E. coli, Salmonella typhimurium und möglicherweise auch in Rps. sulfidophila. Je ein Strukturgen ist verantwortlich für die Synthese von ATP-Sulfurylase, APS-Kinase, PAPS-Sulfotransferase, α-Untereinheit und ß-Untereinheit der Sulfitreduktase (Thiosulfonatreduktase). Ein weiteres in der Reduktion des Sulfit beteiligtes Gen ist möglicherweise an der Synthese des Sirohäms beteiligt (Siegel, 1975). Es liegt getrennt von allen anderen Genen, die an der Cysteinsynthese beteiligt sind, auf dem Chromosom. Die drei Gene, die an der Reduktion des PAPS zu Sulfit, an der Reduktion des Sulfit zu Sulfid und auch an der Reduktion des Thiosulfats gemeinsam beteiligt sind, kontrollieren wahrscheinlich die Synthese des gemeinsamen Kofaktors der Sulfotransferase und Thiosulfonatreduktase, von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase.

Einen Hinweis für diese Vorstellung liefern Mutanten, die in einem dieser Gene defekt sind. Sie können PAPS nicht reduzieren, diese Fähigkeit wird aber durch Dihydrolipoamid wieder hergestellt. Diese Mutanten sind wahrscheinlich durch einen Verlust der Komponente gekennzeichnet, die für das Hefesystem als Fraktion "A" (Thioredoxinreduktase) bezeichnet wurde.

Für die Regulation der Sulfatreduktion auf Enzymebene wird folgendes Bild entworfen:
Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist die Reaktion der Thiosulfonatreduktase, die von gebundenem Sulfid schon in sehr geringer Konzentration gehemmt wird. Um die Konzentration an gebundenem Sulfid möglichst gering zu halten, ist eine hohe Aktivität der O-Acetylserin-Sulfhydrylase nötig, die ihrerseits wieder stark von der O-Acetylserin-Konzentration abhängt und durch Cystein möglicherweise besonders bei niedrigen O-Acetylserin-Konzentrationen gehemmt wird. Cystein hemmt in einer Konzentration von 1 µM die Serintransacetylase bereits zu 50%. Eine Erhöhung der intrazellulären Cysteinkonzentration verlangsamt daher den Umsatz von gebundenem Sulfid, hemmt dadurch die Thiosulfonatreduktase und führt zu einer Inaktivierung der Sulfotransferase durch Mangel an oxidiertem Kofaktor und einen Anstau von gebundenem Sulfit. Die ATP-Sulfurylase wird möglicherweise ebenfalls von gebundenem Sulfid gehemmt, wird aber auch durch ihr eigenes Reaktionsprodukt stark gehemmt. Umgekehrt führt die Erhöhung der O-Acetylserin-Konzentration zu einem Absinken der Konzentration an gebundenem Sulfid in der Zelle, einer Zunahme an oxidiertem bzw. reduziertem Kofaktor und damit zu einer Aktivierung der Sulfotransferase. In etwas modifizierter Form kann das Bild für diese Regulation der Cysteinsynthese auch in Rm. vannielii und den anderen APS-reduzierenden Arten gelten. In R. rubrum fehlt wahrscheinlich die Regulation über das Kofaktorsystem.

ZUSAMMENFASSUNG

I. Im Hinblick auf Ausbeute, Material- und Zeitaufwand wurden Synthese- und Reinigungsverfahren der Schwefelnukleotide APS und PAPS optimiert (siehe Tabelle 1). $AP^{32}S$ wurde mit einem Zellextrakt aus Thiobacillus denitrificans synthetisiert, $AP^{35}S$ mit gereinigter ATP-Sulfurylase und PPase, $PAP^{32}S$ und $PAP^{35}S$ mit einem angereicherten Extrakt aus Bäckerhefe. Die Reinigungsprozeduren der Nukleotide über Ionenaustauschgele (Sephadex A-25 und Biorex 5) mit Tris-HCl-Gradienten waren in jeweils 2-3 Tagen abgeschlossen.

II. Durch Isotopenverdünnungstests mit radioaktiv markiertem $AP^{35}S$ und $PAP^{35}S$ und nicht radioaktivem $AP^{32}S$ und $PAP^{32}S$ (in zehnfachem Überschuß) wurde in Vertretern nahezu aller Rhodospirillaceae geprüft, ob die Sulfatreduktion über APS oder PAPS verläuft.

Rps. capsulata, Rps. sphaeroides, Rps. sulfidophila, Rps. viridis, Rps. palustris, R. rubrum und R. fulvum reduzieren PAPS. Vertreter aller 4 Gattungen der Rhodospirillaceae, nämlich Rps. acidophila, Rps. globiformis, Rm. vannielii, Rc. purpureus, R. tenue und Rps. gelatinosa reduzieren APS.

Erstmals konnte in chemotrophen Bakterien, in Pseudomonas aeruginosa und Alcaligenes eutrophus eine Reduktion des Sulfats über APS nachgewiesen werden. In E. coli, Serratia marcescens, Saccharomyces carlsbergensis und Paracoccus denitrificans wird PAPS reduziert.

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die evolutionären Beziehungen der Organismen diskutiert.

III. Alle Enzyme der Sulfataktivierung und Sulfatreduktion sind in den phototrophen Bakterien im löslichen Protein lokalisiert.

Beide Sulfotransferasen zeigen ein pH-Optimum zwischen 7.5-8.0. Das Temperaturoptimum der APS-Sulfotransferase aus Rm. vannielii 17100 liegt zwischen 30-40°C; die besten sta-

bilisierenden Effekte für dieses Enzym wurden mit KH_2PO_4, DTE und EDTA, $MgCl_2$ und ME erzielt. DTE ist zur Aktivität erforderlich; es kann nur teilweise ersetzt werden durch GSH (R. rubrum, E. coli) oder BAL (R. rubrum, Rm. vannielii, Rps. palustris, Ps. aeruginosa und E. coli).

5'-AMP hemmt die Reduktion von APS, während es wie 3'-AMP und 3'5'-ADP die Aktivität in Extrakten, die PAPS reduzieren, erhöht.

Isoliertes Thioredoxin aus Spinat sowie zelleigene Kofaktorpräparate aktivieren die PAPS-Sulfotransferase in allen untersuchten Stämmen. In Stämmen mit APS-Sulfotransferase zeigen zelleigene Kofaktorpräparate keine Aktivierung, Spinat-Thioredoxin nur teilweise.

Molekulargewichte der APS-Sulfotransferasen aus Rm. vannielii 17100 (73000), Rps. acidophila 7050 (105000), R. tenue BN 230 (80000) und Ps. aeruginosa (140000) wurden bestimmt.

Der isoelektrische Punkt des aktiven Enzyms aus diesen Stämmen liegt bei pH 4.8-4.85, bei R. tenue bei pH 5.0.

Die Abspaltung des Kofaktors vom aktiven Enzym führt zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes zum alkalischen um 0.35-0.9 pH-Einheiten.

IV. In Rps. sulfidophila wurde die Sulfataufnahme untersucht. Es wurden zwei apparente K_m-Werte für Sulfat, 0.32 mM und 5.6 mM bestimmt. Die reduzierten Schwefelverbindungen Sulfit, Sulfid, Cystein, Methionin und Glutathion haben einen hemmenden Einfluß auf die Sulfataufnahme. O-Acetylserin hemmt im Bereich niedriger Konzentrationen (unter 0.5 mM), aktiviert aber in höheren Konzentrationen (über 0.5 mM).

V. In einigen Rhodospirillaceae wurde das Wachstum auf verschiedenen Schwefelquellen getestet. In der Verwertung von Sulfat als Schwefelquelle gestört sind vier der gete-

steten Stämme, und zwar Rps. globiformis 7950, Rps. sulfoviridis P_1, Rps. spec. 51 und Rps. spec. 6 II.
Die Aktivitäten von Sulfotransferase, Thiosulfonatreduktase und APS-Kinase wurden in Zellextrakten von Rm. vannielii, Rps. globiformis und Rps. sulfidophila bestimmt. Die Zellen waren auf verschiedenen Schwefelquellen und in Gegenwart von O-Acetylserin gewachsen.

In R. rubrum, R. tenue, Rps. gelatinosa, Rps. globiformis und Rps. sulfidophila wurde die Aktivität der sulfatassimilierenden Enzyme im Verlauf von Derepressionsexperimenten verfolgt.

Die Aktivitäten aller getesteten Enzyme nahmen durch O-Acetylserin mehr oder weniger stark zu. In allen Stämmen, mit Ausnahme von R. rubrum, steigt die Aktivität der Sulfotransferase am steilsten und höchsten an. In Stämmen, die APS reduzieren, bleibt die Aktivität der APS-Kinase niedrig.

In R. rubrum verläuft der Aktivitätsanstieg von ATP-Sulfurylase und PAPS-Sulfotransferase nahezu parallel. Es wird daher geschlossen, daß die Sulfotransferase in R. rubrum prinzipiell anders reguliert wird als in den anderen untersuchten Arten.

LITERATURVERZEICHNIS

Abrams,W.R. - Schiff,J.A. : Studies of sulfate utilization by algae. 11. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type Chlorella and mutants blocked for sulfate reduction. Arch. Mikrobiol. 94, 1-10 (1973)

Adams,C.A. - Warnes,G.M. - Nicholas,D.J.D. : Preparation of labelled adenosine-5'-phosphosulfate using APS-reductase from Thiobacillus denitrificans. Analyt. Biochem. 42, 207-213 (1971)

Almassy,R.J. - Dickerson,R.E. : Pseudomonas cytochrome c_{551} at 2.0 Å resolution: Enlargement of the cytochrome c family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2674-2678 (1978)

Ambler,R.P. - Daniel,M. - Hermoso,J. - Meyer,T.E. - Bartsch, R.G. - Kamen,M.D. : Cytochrome c_2 sequence variation among the recognized species of purple non-sulfur photosynthetic bacteria. Nature 278, 659-660 (1979)

Asahi,T. - Bandurski,R.S. - Wilson,L.G. : Yeast sulfate-reducing system. II. Enzymatic reduction of protein disulfide. J. Biol. Chem. 236, 1830-1835 (1961)

Baddiley,J. - Buchanan,J.G. - Letters,R. : Synthesis of adenosine-5'-sulfatophosphate. A degradation product of an intermediate in the enzymatic synthesis of sulphuric esters. J. Chem. Soc. 1067-1071 (1957)

Baldensperger,J. - Garcia,J.L. : Reduction of oxidized inorganic nitrogen compounds by a new strain of Thiobacillus denitrificans. Arch. Microbiol. 103, 31-36 (1975)

Beisenherz,G. - Boltze,H.J. - Bücher,T. - Czok,R. - Garbade, K.H. - Meyer-Arendt,E. - Pfleiderer,G. : Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskel in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555-577 (1953)

Brunold,C. - Schmidt,A. : Regulation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by H_2S in Lemna minor L.
Planta 133, 85-88 (1976)

Brunold,C. - Schmidt,A. : Regulation of sulfate assimilation in plants. 7. Cysteine inactivation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase in Lemna minor.
Plant Physiol. 61, 342-347 (1978)

Buchanan,B.B. - Schürmann,P. - Kalberer,P.P. : Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component, and physiological significance of the ferredoxin-linked activation.
J. Biol. Chem. 246, 5952-5959 (1971)

Castenholz,R.W. : The possible photosynthetic use of sulfide by the filamentous phototrophic bacteria of hot springs.
Limnol. Oceanogr. 18, 863-876 (1973)

Chambers,L.A. - Trudinger,P.A. : Cysteine and S-sulphocysteine biosynthesis in bacteria.
Arch. Mikrobiol. 77, 165-184 (1971)

Cherniak,R. - Davidson,E.A. : Synthesis of adenylyl sulfate and adenylyl sulfate 3'-phosphate.
J. Biol. Chem. 239, 2986-2990 (1964)

Cooper,B.P. : Der enzymatische Mechanismus der Sulfataktivierung bei Rhodospirillaceae.
Dissertation, Universität Bonn (1979)

Cooper,B.P. - Trüper,H.G. : Improved synthesis and rapid isolation of millimole quantities of adenylylsulfate.
Z. Naturforsch. 34c, 346-249 (1979)

DeMeio,R.H. : Sulfate activation and transfer. in: Metabolic Pathways, 3. ed., VII. Metabolism of sulfur compounds. D.M.Greenberg, ed., Academic Press, New York, pp. 287-358 (1975)

Dreyfuss,J. : Characterization of a sulfate- and thiosulfate-transporting system in Salmonella typhimurium.
J. Biol. Chem. 239, 2292-2297 (1964)

Dreyfuss,J. - Monty,K.J. : The biochemical characterization of cysteine-requiring mutants of Salmonella typhimurium.
J. Biol. Chem. 238, 1019-1024 (1963a)

Dreyfuss,J. - Monty,K.J. : Coincident repression of the reduction of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, sulfite, and thiosulfate in the cysteine pathway of Salmonella typhimurium.
J. Biol. Chem. 238, 3781-3783 (1963b)

Ellis,R.J. - Humphries,S.K. - Pasternak,C.A. : Repressors of sulphate activation in Escherichia coli.
Biochem. J. 92, 167-172 (1964)

Farley,J.R. - Cryns,D.F. - Yang,Y.H. - Segel,I.H. : Adenosine triphosphate sulfurylase from Penicillium chrysogenum.
J. Biol. Chem. 251, 4389-4397 (1976)

Gibson,J. - Stackebrandt,E. - Zablen,L.B. - Gupta,R. - Woese,C.R.: A phylogenetic analysis of the purple photosynthetic bacteria.
Current Microbiol. 3, 59-64 (1979)

Hansen,T.A.: Sulfide als electronendonor voor Rhodospirillaceae.
Dissertation, Universität Groningen (1974)

Hansen,T.A. - van Gemerden,H.: Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria.
Arch. Mikrobiol. 86, 49-56 (1972)

Hansen,T.A. - Veldkamp,H.: Rhodopseudomonas sulfidophila, nov. spec., a new species of the purple nonsulfur bacteria.
Arch. Mikrobiol. 92, 45-58 (1973)

Hensel,G.: O-Acetylserin-Sulfhydrylase und S-Sulfocystein-Synthase aus Chromatium vinosum und Rhodospirillum tenue: molekulare, kinetische und regulatorische Eigenschaften.
Dissertation, Universität Bonn (1979)

Hensel,G. - Trüper,H.G.: Cysteine und S-sulfocysteine biosynthesis in phototrophic bacteria.
Arch. Microbiol. 109, 101-103 (1976)

Hodson,R.C. - Schiff,J.A.: Preparation of adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS): an improved enzymatic method using Chlorella pyrenoidosa.
Arch. Biochem. Biophys. 132, 151-156 (1969)

Ibanez,M.L. - Lindstrom,E.S.: Photochemical sulfate reduction by Rhodospirillum rubrum.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1, 224-227 (1959)

Ibanez,M.L. - Lindstrom,E.S.: Metabolism of sulfate by the chromatophore of Rhodospirillum rubrum.
J. Bacteriol. 84, 451-455 (1962)

Imhoff,J.F.: Phototrophe Bakterien salzhaltiger Standorte: Ökologische und taxonomische Aspekte. Diplomarbeit, Universität Bonn (1976)

Imhoff,J.F. - Trüper,H.G.: Marine sponges as habitats of anaerobic phototrophic bacteria. Microbial Ecol. 3, 1-9 (1976)

Imhoff,J.F. - Trüper,H.G.: Ectothiorhodospira halochloris sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch. Microbiol. 114, 115-121 (1977)

Imhoff,J.F.: Mineral salt responses in anoxygenic phototrophic bacteria. in: CRC-Handbook of biosolar resources (im Druck)

Jones-Mortimer,M.C. - Wheldrake,J.F. - Pasternak,C.A.: The control of sulphate reduction in E. coli by O-acetyl-L-serine. Biochem. J. 107, 51-53 (1968)

Keppen,O.I. - Gorlenko,V.M.: A new species of purple budding bacteria containing bacteriochlorophyll b. Mikrobiologiya 44, 258-263 (1975)

Kredich,N.M.: Regulation of L-cysteine biosynthesis in Salmonella typhimurium. I. Effects of growth on varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. J. Biol. Chem. 246, 3474-3484 (1971)

Kredich,N.M. - Tomkins,G.M.: The enzymatic synthesis of L-cysteine in E. coli and Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 241, 4955-4965 (1966)

Laurent,T.C. - Moore,E.C. - Reichard,P.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides IV.Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 239, 3436-3444 (1964)

Leinweber,F.-J. - Monty,K.J.: The metabolism of thiosulfate in Salmonella typhimurium.
J. Biol. Chem. 238, 3775-3780 (1963)

Lippert,K.D.: Die Verwertung von molekularem Wasserstoff durch Chlorobium thiosulfatophilum.
Dissertation, Universität Göttingen (1967)

MacKay,R.M. - Zablen,L.B. - Woese,C.R. - Doolittle,W.F.: Homologies in processing and sequence between the 23S ribosomal ribonucleic acids of Paracoccus denitrificans and Rhodopseudomonas sphaeroides.
Arch. Microbiol. 123, 165-172 (1979)

Madigan,M.T. - Brock,T.D.: Photosynthetic sulfide oxidation by Chloroflexus aurantiacus, a filamentous photosynthetic gliding bacterium.
J. Bacteriol. 122, 782-784 (1975)

Marx,W. - Shoyab,M. - Su,L.Y.: Yeast ATP sulfurylase-ATP complex.
Int. J. Biochem. 5, 471-477 (1974)

Pachmayr,F.: Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen im Mineralwasser.
Dissertation, Universität München (1960)

Pasternak,C.A.: Sulphate activation and its control in Escherichia coli and Bacillus subtilis.
Biochem. J. 85, 44-49 (1962)

Pasternak,C.A. - Ellis,R.J. - Jones-Mortimer,M.C. - Crichton,C.E.: The control of sulphate reduction in bacteria.
Biochem. J. 96, 270-275 (1965)

Paynter,D.J. - Anderson,J.W.: Comparative enzymology of the adenosine triphosphate sulfurylases from leaf and swollen hypocotyl tissue of Beta vulgaris. Plant Physiol. 53, 180-186 (1974)

Peck,H.D. : Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. J. Bacteriol. 82, 933-939 (1961)

Peck,H.D. - Tedro,S. - Kamen,M.D.: Sulfite reductase activity in extracts of various photosynthetic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2404-2406 (1974)

Pfennig,N.: Rhodopseudomonas globiformis, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. Arch. Microbiol. 100, 197-206 (1974)

Pigiet,V. - Conley,R.R.: Isolation and characterization of phosphothioredoxin from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 253, 1910-1920 (1978)

Porque,P.G. - Baldesten,A. - Reichard,P.: The involvment of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. J. Biol. Chem. 245, 2371-2374 (1970 a)

Porque,P.G. - Baldesten,A. - Reichard,P.: Purification of a thioredoxin system from yeast. J. Biol. Chem. 245, 2363-2370 (1970 b)

Reichard,P. - Ringertz,N.R.: Synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate. J. Americ. Chem. Soc. 81, 878-881 (1959)

Robbins,P.W.: Sulfate-activating enzymes. in: Methods in enzymology, Vol. V, Colowick,S.P. and Kaplan, N.O. eds., Academic Press, New York, pp.964-977 (1962)

Robbins,P.W.: Preparation and properties of sulfur adenylates. in: Methods in Enzymology, Vol. VI, Colowick,S.P. and Kaplan,N.O. eds., Academic Press, New York, pp. 766-775 (1963)

Robbins,P.W. - Lipmann,F.: Isolation and identification of active sulfate.
J. Biol. Chem. 229, 837-851 (1957)

Robbins,P.W. - Lipmann,F.: Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate.
J. Biol. Chem. 233, 686-690 (1958a)

Robbins,P.W. - Lipmann,F.: Separation of two enzymatic phases in active sulfate synthesis.
J. Biol. Chem. 233, 681-686 (1958b)

Schedel,M.: Untersuchungen zur anaeroben Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen durch Thiobacillus denitrificans, Chromatium vinosum und Chlorobium limicola. Dissertation, Univers. Bonn (1978)

Schedel,M. - Trüper,H.G.: Purification of Thiobacillus denitrificans siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties.
Biochem. Biophys. Acta 568, 454-467 (1979)

Schedel,M. - Vanselow,M. - Trüper,H.G.: Siroheme sulfite reductase isolated from Chromatium vinosum. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties.
Arch. Microbiol. 121, 29-36 (1979)

Schmidt,A.: On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction. An APS-Sulfotransferase from Chlorella.
Arch. Mikrobiol. 84, 77-86 (1972)

Schmidt,A.: Sulfate reduction in a cell-free system of Chlorella. The ferredoxin dependent reduction of a protein-bound intermediate by thiosulfonate reductase.
Arch. Mikrobiol. 93, 29-52 (1973)

Schmidt,A. : Distribution of the APS-sulfotransferase activity among higher plants.
Plant Sci. Lett. 5, 407-415 (1975)

Schmidt,A. : The adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase from spinach (Spinacea oleracera L.) Stabilization, partial purification, and properties.
Planta 130, 257-263 (1976)

Schmidt,A. : Adenosine-5'-phosphosulfate (APS) as sulfate donor for assimilatory sulfate reduction in Rhodospirillum rubrum.
Arch. Microbiol. 112, 263-270 (1977 a)

Schmidt,A. : Assimilatory sulfate reduction via 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) and adenosine-5'-phosphosulfate (APS) in blue-green algae.
FEMS Lett. 1, 137-140 (1977 b)

Schmidt,A. - Schwenn,J.D.: On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction. in: Proc. 2. Intern. Congr. Photosyn. Research, pp. 507-514, The Hague: W.Junk (1971)

Schmidt,A. - Abrams,W.R. - Schiff,J.A.: Reduction of adenosine-5'-phosphosulfate to cysteine in extracts from Chlorella and mutants blocked for sulfate reduction.
Eur. J. Biochem. 47, 423-434 (1974)

Schmidt,A. - Trüper,H.G.: Reduction of adenylylsulfate and 3'-phosphoadenylylsulfate in phototrophic bacteria.
Experientia 33, 1008-1009 (1977)

Schmidt,A. - Christen,U.: A factor-dependent sulfotransferase specific for 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) in the Cyanobacterium Synechococcus 6301.
Planta 140, 239-244 (1978)

Schmidt,K. - Liaaen-Jensen,S. - Schlegel,H.G.: Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch. Mikrobiol. 46, 117-126 (1963)

Schwenn,J.D. - El-Shagi,H. - Kemena,A. - Petrak,E.: On the role of S:sulfotransferases in assimilatory sulfate reduction by plant cell suspension cultures. Planta 144, 419-425 (1979)

Shaw,W.H. - Anderson,J.W.: The enzymology of adenosine triphosphate sulfurylase from spinach leaf tissue. Biochem. J. 139, 27-35 (1974)

Siegel,L.M.: Biochemistry of the sulfur cycle. in: Metabolic Pathways, VII.:Metabolism of sulfur compounds. D.M.Greenberg, ed., Academic Press, New York, pp. 217-286 (1975)

Taussky,H.H. - Shorr,E.: A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202, 675-685 (1953)

Thiele,H.H.: Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Thiorhodaceae: Wasserstoffdonatoren und Sulfatreduktion. Dissertation, Universität Göttingen (1966)

Torri,K. - Bandurski,R.S.: Yeast sulfate reducing system. III. An intermediate in the reduction of 3'-phosphoryl-5'-adenosinephosphosulfate to sulfite. Biochim. Biophys. Acta 136, 286-295 (1967)

Trüper,H.G.: Sulfur metabolism. in: The Photosynthetic Bacteria. R.K.Clayton, W.R.Sistrom, eds., Plenum Press, New York, pp. 677-690 (1978)

Tsang,M.L.-S. - Lemieux,J. - Schiff,J.A. - Bojarski,T.B.: Preparation of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) from adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS) prepared by an improved procedure. Analyt. Biochem. 74, 623-626 (1976)

Tsang,M.L.-S. - Schiff,J.A.: Studies of sulfate utilization by algae. 14. Distribution of adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS) and adenosine-5'-phosphosulfate (APS) sulfotransferases in assimilatory sulfate reducers. Plant Sci. Lett. 4, 301-307 (1975)

Tsang,M.L.-S. - Schiff,J.A.: Sulfate-reducing pathway in Escherichia coli involving bound intermediates. J. Bacteriol. 125, 923-933 (1976)

Tweedie,J.W. - Segel,I.H.: Adenosine triphosphate sulfurylase from Penicillium chrysogenum. J. Biol. Chem. 246, 2438-2446 (1971)

Varma,A.K. - Nicholas,D.J.D.: Studies on the incorporation of labelled sulfate into cells and cell-free extracts of Nitrosomonas europaea. Arch. Mikrobiol. 73, 293-307 (1970)

Varma,A.K. - Nicholas,D.J.D.: Purification and properties of ATP-sulfurylase from Nitrobacter agilis. Biochim. Biophys. Acta 227, 373-389 (1971a)

Varma,A.K. - Nicholas,D.J.D.: Metabolism of ^{35}S-sulfate and properties of APS-kinase and PAPS-reductase in Nitrobacter agilis. Arch. Mikrobiol. 78, 99-117 (1971b)

Wagner,W. - Follmann,H. - Schmidt,A.: Multiple functions of thioredoxins.
Z. Naturforsch. 33c, 517-520 (1978)

Warburg,O. - Christian,W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase.
Biochem. Z. 310, 384-421 (1941)

Wheldrake,J.F.: Intracellular concentration of cysteine in Escherichia coli and its relation to repression of the sulphate-activating enzymes.
Biochem. J. 105, 697-699 (1967)

Wheldrake,J.F. - Pasternak,C.A.: The control of sulphate activation in bacteria.
Biochem. J. 96, 276-280 (1965)

Wilson,L.G. - Bandurski,R.S.: Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate and molybdate.
J. Biol. Chem. 233, 975-981 (1958)

Wilson, L.G. - Asahi,T. - Bandurski,R.S.: Yeast sulfate-reducing system. I. Reduction of sulfate to sulfite.
J. Biol. Chem. 236, 1822-1829 (1961)

Wilson,L.G. - Bierer,D.: The formation of exchangeable sulphite from adenosine-3'-phosphate-5'-sulfatophosphate in yeast.
Biochem. J. 158, 255-270 (1976)

Wyss,H.-R. - Brunold,C.: Regulation of adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by H_2S and cyst(e)ine in primary leaves of Phaseolus vulgaris L.
Planta 147, 37-42 (1979)

Zeikus,J.G.: The biology of methanogenic bacteria.
Bact. Rev. 41, 514-541 (1977)

Herrn Prof. Dr. H. G. Trüper möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung danken, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde. Herrn Prof. Dr. A. Schmidt (München) möchte ich für wertvolle Hinweise zur Methodik des Sulfotransferase-Tests danken. Mein Dank gilt auch allen anderen, die am Gelingen dieser Arbeit mitgeholfen haben, vor allen Frl. Monika Kramer, die mit ihrem unermüdlichen Einsatz große Teile der experimentellen Arbeit bestritt.

Lebenslauf

Am 8. Juli 1951 wurde ich als viertes von fünf Kindern meiner Eltern Johannes und Johanna Imhoff (geb. Iwan) in Prüm geboren. Von Ostern 1958-1962 besuchte ich die Volksschule in Prüm und anschließend bis zum Sommer 1970 den altsprachlichen Zweig des Staatlichen Regino-Gymnasiums in Prüm.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich mit dem Studium in Chemie und Biologie in Bonn. Während der ersten vier Semester lag der Schwerpunkt der Studien im chemischen Bereich. Durch die Einrichtung eines Lehrstuhls für Mikrobiologie im Sommersemester 1972 und mein starkes Interesse an diesem Fachgebiet verlagerte sich der Studienschwerpunkt auf die biologischen Fächer. Im Frühjahr 1973 legte ich die mündlichen Prüfungen zum Vordiplom ab. Nach Abschluß der mündlichen Diplom-Prüfungen Ende 1974 und Abgabe der praktischen Arbeit, die unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Trüper angefertigt wurde, erhielt ich im März 1976 das Diplom in Biologie. Seitdem arbeite ich an der vorliegenden Dissertation, die durch ein Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes unterstützt wurde, und seit einer Exkursion ins Wadi Natrun im Sommer 1976 nebenher an der Charakterisierung halophiler phototropher Bakterien. Seit November 1978 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn beschäftigt.